



등록특허 10-2411834



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월21일
(11) 등록번호 10-2411834
(24) 등록일자 2022년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) A61K 35/39 (2015.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0676 (2013.01)
A61K 35/39 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7037011
(22) 출원일자(국제) 2015년06월02일
심사청구일자 2020년06월02일
(85) 번역문제출일자 2016년12월29일
(65) 공개번호 10-2017-0023029
(43) 공개일자 2017년03월02일
(86) 국제출원번호 PCT/CA2015/050509
(87) 국제공개번호 WO 2015/184544
국제공개일자 2015년12월10일
(30) 우선권주장
62/007,626 2014년06월04일 미국(US)

(73) 특허권자
프로토키네틱스 인코포레이티드
미합중국 웨스트버지니아 26170, 세인트 마리스,
사우스 플레전트 하이웨이, 9176
(72) 발명자
샤피로, 에이. 엠. 제임스
캐나다 알버타 티6지 1티7, 에드몬튼, 엔더블유,
118스트리트, 9120
영, 래칠란 그랜트
캐나다 브리티시 컬럼비아 브이7더블유 2씨6, 웨
스트 밴쿠버, 로즈버리 6438
(74) 대리인
특허법인(유한) 대아

전체 청구항 수 : 총 16 항

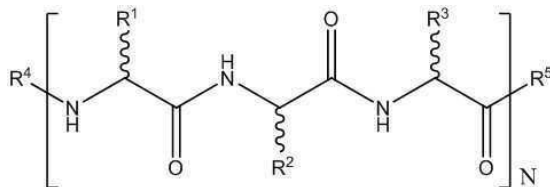
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 이식 결과 개선 및 체장 세포 건강, 생존 향상을 위한 항-노화 글리코펩타이드들의 용도

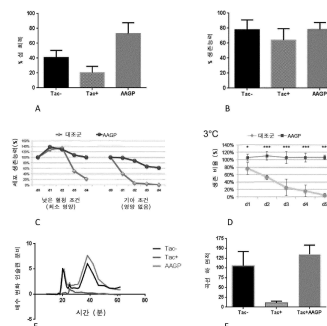
(57) 요약

본 발명은 단리된 체장 세포의 생착을 증강시키기 위한 시험관 내 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 체장 세포를 일반 화학식 I의 펩-디플루오르화된 C- 당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

일반 화학식 I



대표도



(52) CPC특허분류

C12N 2501/90 (2013.01)

C12N 2501/998 (2013.01)

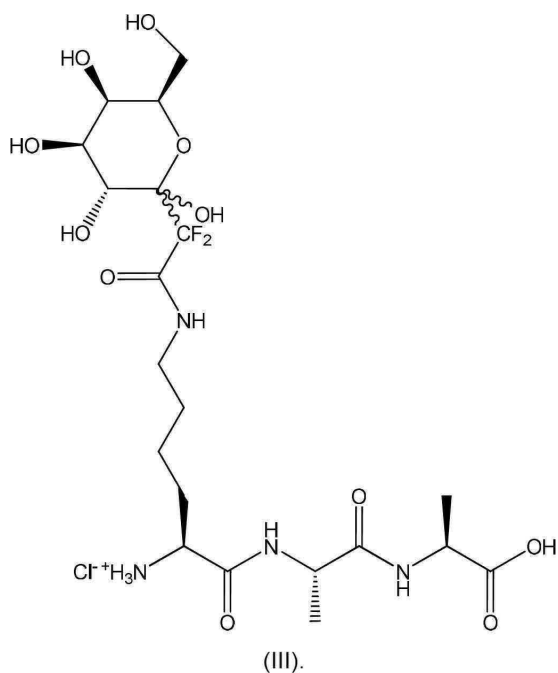
C12N 2501/999 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

화학식 III의 겐-디플루오르화된(gem-difluorinated) C-당펩티드 화합물, 또는 화학식 III의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물(hydrate) 또는 용매 화합물(solvate)을 포함하는, 면역억제제 약물로 면역억제된(immunosuppressed), 이식을 필요로 하는 개체에서, 이식(transplantation) 전, 면역억제제 약물 독성으로부터 보호를 위한, 단리된 췌장 세포들(pancreatic cells), 단리된 췌장 선조 세포들(pancreatic progenitor cells), 또는 둘다의 치료를 위한 약학적 조성물:



청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단리된 췌장 세포는 단리된 알파 세포, 단리된 베타 세포, 단리된 델타 세포, 단리된 감마 세포, 엡실론 세포, 또는 이의 조합인, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항 내지 제 2항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단리된 췌장 세포는 단리된 베타 세포인, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 면역억제제 약물은 타크로리무스(tacrolimus)인, 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항에 있어서,
상기 개체(subject)는 인간 개체인, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항 또는 제 2항에 있어서,
상기 분리된 췌장 세포, 분리된 췌장 선조 세포, 또는 둘다의 생체(live) 기증자, 시체 기증자, 또는 이의 조합들로부터 분리되는, 약학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제 1항 또는 제 2항에 있어서,
상기 화학식 III의 화합물은 약 0.01 mg/ml 내지 약 5 mg/ml의 농도에서 사용되는, 약학적 조성물.

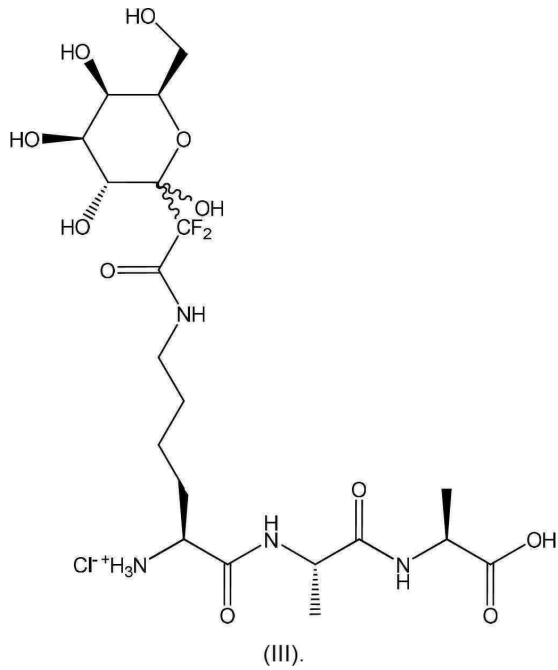
청구항 10

제 1항 또는 제 2항에 있어서,
상기 화학식 III의 화합물은 약 1 mg/ml 내지 약 5 mg/ml의 농도에서 사용되는, 약학적 조성물.

청구항 11

하기 단계를 포함하는, 면역억제제 약물로 면역억제된, 이식을 필요로 하는 개체에서 이식 전, 면역억제제 약물 독성으로부터 분리된 췌장 세포들(pancreatic cells), 분리된 췌장 선조 세포들(pancreatic progenitor cells), 또는 둘다를 보호하기 위한 시험관 내(in vitro) 방법이며, 이때 상기 면역억제제 약물은 타크로리무스(tacrolimus), 사이클로스포린(cyclosporine), 또는 이의 조합인, 시험관 내 방법:

a) 화학식 III의 겐-디플루오르화된(gem-difluorinated) C-당펩티드(glycopeptide) 화합물, 또는 화학식 III의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 분리된 췌장 세포(pancreatic cell), 분리된 췌장 선조 세포(pancreatic progenitor cell), 또는 둘다를 접촉시키는 단계:



청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 단리된 췌장 세포는 단리된 알파 세포, 단리된 베타 세포, 단리된 델타 세포, 단리된 감마 세포, 엡실론 세포, 또는 이의 조합인, 방법.

청구항 13

제 12항에 있어서,

상기 단리된 췌장 세포는 단리된 베타 세포인, 방법.

청구항 14

제 11항에 있어서,

상기 면역억제제 약물은 타크로리무스인, 방법.

청구항 15

제 11항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개체는 인간 개체인, 방법.

청구항 16

제 11항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포, 또는 둘다는 생체 기증자, 시체 기증자, 또는 이의 조합들로부터 단리되는(isolated), 방법.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

제 11항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화학식 III의 화합물은 약 0.01 mg/ml 내지 약 5 mg/ml의 농도에서 사용되는, 방법.

청구항 20

제 11항 내지 제 14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화학식 III의 화합물은 약 1 mg/ml 내지 약 5 mg/ml의 농도에서 사용되는, 방법.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원에 개시된 청구 주제는 일반적으로는 노화 방지용 당펩티드의 용도에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 상기 청구 주제는 인간 췌장 세포의 생착(engraftment)을 증강시키기 위한 노화 방지용 당펩티드의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결빙 방지용 생물학적 화합물 및 특히 당단백질은 자연 환경에 존재한다. 이들 화합물은, 예를 들어 몇몇 물고기에 존재하여, 이들 물고기가 저온 환경(즉, 0℃에 가깝거나 영하의 온도)에서 생존할 수 있도록 한다. 과학자들은 자연 환경(물고기, 양서류, 식물, 곤충 등)으로부터 채취한 결빙 방지용 화합물이 어떻게 이들 환경에 영향을 미치는 지에 관해 연구해 왔다. 충분히 안정하며 그 활성이 상업적 응용을 위해 적어도 천연 분자의 활성과 동일하거나 심지어는 더욱 우수한 유사한 화합물들의 합성에 연구의 초점이 맞춰져 왔다.

[0003] 동결 방지용 단백질(AFP)은 다양한 조건 하에서 세포를 보호하는 이들의 능력으로 인해 관심이 증가하였다. 이들은 기타 한랭 기후에 살아가는 무척추동물뿐만 아니라 북극 및 남극 물고기에서 자연적으로 마주치게 되며, 영하의 온도에서 세포 및 조직을 기능적으로 유지하는데 책임이 있다. AFP는 1950년대에 성공적으로 단리되었으며, 얼음 결정과 결합함으로써 체액의 결빙 온도를 비-총괄적으로 낮추는 능력을 증명하였다.

[0004] 기관 및 조직의 이식 분야에서 이들 화합물을 이용한 초기 실험에서는 유망한 결과를 나타냈으며, 이는 회수/보존/재관류 과정과 연관된 유해한 조건에 대해 세포를 보호하도록 상기 화합물을 매력적인 치료제 후보물질로 만들었다. 더욱이, 랑게르한스섬(islet of Langerhans)을 포함한 상이한 세포의 동결보존 도중에 추가의 이점이 증명되었으며, 그 결과 냉동보존술(cryostasis) 도중에 AFP가 보충되는 경우에 이들의 생존능력 및 기능이 유의

하게 증가되었다. 본 발명에서 사용된 노화 방지용 당펩티드(AAGP™)는 동결 방지용 당단백질의 유사체를 수득하려는 시도에서 유래한다.

[0005] 노화 방지용 당펩티드(AAGP™) 화합물은 쥘-디플루오르화된 C-당펩티드로서, 영양분 결핍, 고온 및 동결보존, 과산화수소(H₂O₂)로부터의 산화적 스트레스, UV 조사 및 염증과 같은 혹독한 세포 스트레스 하에서의 적용 가능성을 갖는 것을 제안되었다.

[0006] 베타 세포 이식은 기증자 췌장으로부터의 분리된 베타 섬 세포(beta islet cell)의 이식 및 다른 사람으로부터의 이식이다. 이는 1형 진성 당뇨병에 대한 실험적 치료이다. 일단 이식되면, 베타 섬 세포는 인슐린을 생성하기 시작하여, 활성적으로 혈액 중의 글루코오스 수준을 조절한다. 섬 이식 분야에서 유의한 진전이 이루어졌을지라도 현재 이의 광범위한 적용을 가로막는 많은 장애가 존재한다. 2개의 가장 중요한 제약으로는 섬 거부반응(islet rejection)을 방지하기 위한 현재 수단의 부적절성 및 이식을 위한 베타 섬 세포의 공급의 제한이 있다. 현재의 면역억제 요법들은 수개월 내지 수년 동안 베타 섬 세포의 부전(failure)을 예방할 수 있지만, 이들 치료에 사용된 약제들은 고가이며, 특정 악성 종양 및 기회감염에 대한 위험성을 증가시킬 수 있다. 게다가 다소 반어적으로, 가장 일반적으로 사용되는 약제(다클리주맙(daclizumab; Zenapax™), 시롤리무스(sirolimus; Rapamune™) 및 타크로리무스(tacrolimus; Prograf™)를 포함함)들은 또한 정상적인 베타 섬 세포의 기능 및/또는 인슐린 작용을 손상시키는 것으로 공지되어 있다.

[0007] 섬 이식의 장기적 결과는 고도로 전문화된 중심에서 유의하게 향상되었으며, 5년 동안의 인슐린 자립율(independence rate)은 50%를 초과하였다. 임의의 비율로 인해 지연 시점에 인슐린 치료법의 재도입이 요구된다. 다수의 인자는 내문 주입(intraportal infusion) 이후에 특히 초기 단계에서 상당한 이식편(graft) 손실에 책임이 있으며, 불충분한 섬 질량(islet mass)은 환자에서 지속적인 혈당 조절을 제한할 수 있다. 적절한 혈관형성(vascularization)이 재확립되기 전 이식 직후에 많은 섬이 사멸함에 따라 심각한 이식편 손실을 초래하는 하나의 인자는 저산소증(hypoxia)이다. 이식편 손실에 대한 기타 이유로는 즉각적인 혈액-매개 염증 반응, 동종면역(alloimmunity), 자가면역의 재발, 및 당뇨 유발성 면역 억제제에 대한 만성적인 노출을 들 수 있다. 이들 인자들은 약 60%의 즉각적인 초기 섬 손실에 책임이 있으며, 그 결과 기능성 이식체(transplant)를 유지하기에 불충분한 섬 질량을 초래한다.

[0008] 이러한 증거를 고려하여, 현재 보건학, 특히 이식 분야에서 AFP 및 이들의 잠재적인 사용에 대해 상당한 관심을 기울이고 있다. 그러나 주요한 초기 이식편의 손실이 불가피한 것으로 보이는 섬 이식에서 잠재적인 영향을 반영하는 데이터가 부족하다. 초기 섬 질량의 보존을 위한 지표로서 정상 온도 배양 조건에서 유지된 후 독성에 노출되고 면역결핍 마우스 모델에 이식된 분리된 인간 섬에서 이러한 AAGP™ 화합물의 세포 보호 효과를 시험하였다.

[0009] 따라서 분리된 섬 세포의 공급을 향상시키는 방법에 대한 필요성이 존재한다.

[0010] 분리된 세포의 건강 및 생존을 향상시키는 방법에 대한 필요성이 존재한다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 인간 베타 세포의 건강을 증강시키기 위한 AAGP™의 용도를 나타낸다. (A) AAGP™의 유무 하에 24시간 이후 베타 섬 세포의 회복(그룹 당 n = 6); (B) AAGP™의 유무 하에 24시간 이후 베타 섬 세포의 생존능력(사이토®(Syto®) 그린/EB를 이용하여 측정된 바와 같음)(그룹 당 n = 6); 및 (C-D) AAGP™의 유무 하에 글루코오스-자극 인슐린 방출(그룹 당 n = 3).

도 2는 타크로리무스(Tac) 독성에 대해 인간 베타 섬 세포의 건강 섬을 보호하기 위한 AAGP™의 용도를 나타낸다. (A) AAGP™의 유무 하에 Tac 노출 이후 베타 섬 세포의 회복(그룹 당 n = 6), (B-D) AAGP™의 유무 하에 Tac 노출 이후 베타 섬 세포의 생존능력(사이토® 그린/EB를 이용하여 측정된 바와 같음)(그룹 당 n = 6); 및 (E-F) AAGP™의 유무 하에 Tac 노출 이후 글루코오스-자극 인슐린 방출(그룹 당 n = 6).

도 3은 이식 결과를 향상시키기 위한 AAGP™의 용도를 나타낸다. (A-D) AAGP™의 유무 하에 24시간 이후 이식편의 기능(n = 4 및 5 각각), (E-F) AAGP™의 유무 하에 24시간 이후 이식편의 기능(글루코오스 내성 시험) 및 (G) AAGP™로 처리되거나 무처리된 베타 섬 세포의 이식 60일 후 정상 혈당(euglycemia)의 비율(%) (n = 4 및 5).

도 4는 AAGP™ 보충 유무 하의 배양에서 인간 섬에 대한 시험관 내 평가를 나타낸다. (A) 배양 24시간 후 섬 회

복울에서의 차이($p = 0.02$). (B) 글루코오스-자극 인슐린 분비(GSIS)를 비교한 주변관류 곡선(perifusion curve)에 의한 기능 평가. (C) 주변관류 곡선에 상응하는 곡선 하의 면적에서의 차이. 데이터 점은 평균 \pm SEM($n = 3$), $*P < 0.05$, $***p < 0.001$ 및 $****p < 0.0001$ 을 나타낸다.

도 5는 AAGP™ 보충 및 타크로리무스 노출 유무 하의 배양에서 인간 섬에 대한 시험관 내 평가를 나타낸다. (A) 배양 및 타크로리무스 노출 이후 섬 회복율에서의 차이. (B) 상이한 배양 조건에 대해 글루코오스-자극 인슐린 분비(GSIS)를 비교한 주변관류 곡선에 의한 기능 평가. (C) 주변관류 곡선에 상응하는 곡선 하의 면적에서의 차이. 데이터 점은 평균 \pm SEM($n = 6$), $**p < 0.01$ 및 $***p < 0.001$ 을 나타낸다.

도 6은 글루코오스-자극 인슐린 분비(GSIS)를 비교한 주변관류 곡선에 나타난 상당히 더 양호한 기능(B)과 결합된 배양 및 타크로리무스 노출(Tac+AAGP™) 이후 회복율의 증가(A)를 나타낸다. Tac+ 그룹은 어떠한 반응도 야기하지 않았다. (C) 주변관류 곡선에 상응하는 곡선 하의 면적. 데이터 점은 평균 \pm SEM($n = 6$), $**p < 0.01$ 및 $***p < 0.001$ 을 나타낸다. (D) AAGP™의 부재 시 타크로리무스에 노출된 인간 섬에서의 세포 외 활성 산소종(ROS)의 증가. 산화적 스트레스는 아크리단 루미노젠(Acridan Luminogen) PS-3 검정($n = 3$)에 의해 분석된 세포 외 ROS의 배수 증가에 의해 측정되었다. 배지로부터 AAGP™ 및 타크로리무스를 세척한 이후 3일 이상 동안 모델 A 섬을 방지하였다. GSIS 정적 검정 및 세포 내 인슐린 함량은 상이한 그룹에 대해 3일째(Tac 존재) 및 7일째(Tac 부재) 날에 측정되었다. (E) Tac+ 그룹에 대한 자극 지수(SI)는 Tac+AAGP™와 비교해서 3일째 날에 유의하게 감소한다. 7일째 날의 SI는 유사하며, 이는 Tac가 더 이상 존재하지 않을 때의 기능 회복을 나타낸다. 기능에서의 변화에도 불구하고, 3일째 및 7일째 날(G)뿐만 아니라 기준선(F)에서 측정된 세포 외 인슐린 함량에서는 어떠한 유의한 변화도 없었다. 데이터 점은 2개의 상이한 제제로부터 3회 실험에 대한 평균 \pm SEM을 나타낸다.

도 7은 AAGP™ 효과가 타크로리무스에 의한 직접적인 약물 억제의 결과가 아니라는 것을 나타낸다. 동종 혼합 림프구 반응(MLR)은 직접적인 약물 억제를 평가하기 위해 사용되었다. 결과에 따르면, 타크로리무스, AAGP™ 및 이 둘의 조합의 존재 시에 T 세포 증식에서 유의하게 감소하는 것으로 나타나며, 그 결과 AAGP™에 의한 타크로리무스의 직접적인 억제는 없는 것으로 증명된다. 데이터 점은 평균 \pm SEM($n = 6$), $***p < 0.001$ 및 $****p < 0.0001$ 을 나타낸다.

도 8은 타크로리무스에 대한 급성 노출이 세포 내 칼슘 함량에 영향을 미치지 않지만, 외포작용(exocytosis)을 감소시킨다는 것을 나타낸다. 섬 내 칼슘 농도는 실험 개입에도 불구하고 변하지 않은 채 유지된다. (A) 비교용 세포 내칼슘 농도 및 (B) 상응하는 곡선 하의 면적($n = 10$; 2개의 상이한 제제의 16개의 섬). 정전용량(capacitance)의 측정은 외포작용에서의 차이를 기능적으로 확인하기 위해 수행되었다. (C) 이들의 상응하는 곡선 하의 면적(D)뿐만 아니라 나머지 그룹과 비교 시에 Tac+에서 누적 정전용량에서의 감소; 이는 그룹 사이의 외포작용에서 유의한 차이를 나타낸다. 데이터 점은 평균 \pm SEM($n = 100$ (2회의 단리에서 3회 실험에서의 그룹당 섬의 개수))을 나타낸다.

도 9는 이식 이후(24시간 후) 급성으로 발현된 전염증성 사이토카인 및 케모카인을 나타낸다. IL-1 β (A), IL-6(B), TNF(C) 및 각질 형성 세포(keratinocyte) 케모카인(KC)(D)의 농도는 균질화에 의해 이식편에 대해 국부적으로 측정되었다. (A) IL-1 β , IL-6 및 각질 형성 세포 케모카인(KC)의 농도는 AAGP™로 미리 처리된 생착된 섬에서 유의하게 낮았다. 사이토카인은 균질화에 의해 이식편에 대해 국부적으로 측정되었다(조직 1g에 대해 정규화됨; $n = 3$). 데이터 점은 조직 1g에 대해 정규화된 평균 \pm SEM(단위: pg/ml)($n = 3$), $***p < 0.001$ 및 $****p < 0.0001$ 을 나타낸다.

도 10은 이식 24시간 후에 급성으로 측정된 세포사멸(apoptosis)을 나타낸다. (A) 인슐린(적색), TUNEL(녹색) 및 핵(청색)에 대한 다중 염색을 보여주는 대표적인 슬라이드. (B) TUNEL 양성 세포의 비율(%)을 측정하였고, 그 결과 Tac+ 그룹에서 유의하게 높게 나타났다. (C) 균질화에 의해 Tac+ 그룹에서 더욱 높은 세포 사망률이 확인된 이후 이식편에서 국부적으로 발현된 개열(cleavage)된 카스파아제-3(caspase-3)의 농도. 결과는 순전한(naive) 신장 조직에 대비하여 배수 변화의 증가로서 표시된다. 결과는 순전한 신장 조직에 대비하여 배수 변화의 증가로서 표시된다. (C) 이식 이후 급성으로 측정된 세포사멸의 표시로서 상이한 연구 그룹에서의 TUNEL 양성 세포의 비율(%). 데이터 점은 조직 1g에 대해 조절된 평균 \pm SEM($n = 3$), $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ 및 $****p < 0.0001$ 을 나타낸다.

도 11은 최소 인간 섬 질량(약 1000IEQ)을 투여 받은 면역결핍 마우스에서 이식 후 이식편의 기능을 나타낸다. 따라서 섬은 AAGP™ 및 타크로리무스로 앞서 처리되었다. (A) 장기적 이식편 기능(60일)을 증명한 혼합 혈당 프로파일(pooled blood glucose profile). 점선은 60일째 날에 이식편 회복 신장 절제술(nephrectomy)을 나타낸다.

다. (B) 글루코오스 볼루스(glucose bolus)를 투여 받은 이후 대사 반응을 평가하기 위한 복강 내 글루코오스 내성 시험(IPGTT). (C) 잔류 섬 질량의 표시로서 이식 60일 후 제거된 이식편의 인슐린 함량. 데이터 점은 조직 1g에 대해 조절된 평균 \pm SEM(Tac-: n = 6, Tac+: n = 3 및 Tac+AAGPTM: n = 7), *p < 0.05, **p < 0.01 및 ***p < 0.001을 나타낸다. (D) 및 (E) 공통 유전자(syngeneic)의 전체 질량(약 500IEQ)의 섬 이식을 받은 마우스에서 이식 후 이식편의 기능. AAGPTM은 이식 1시간 전에 배양 배지에 첨가하고, 타크로리무스를 1mg/kg/1일의 연속 속도로 피하 삼투 펌프(동일한 과정 도중에 이식됨)를 통해 투여되었다. (D) Tac가 존재하는 도중에 Tac+ 섬에 대한 명백한 기능 장애를 갖는 동물에 대한 40일에 걸친 혼합 혈당 프로파일. 수직 점선은 타크로리무스 처리 중단을 나타내며, Tac+ 이식편의 점진적인 회복을 표시한 것이다. y = 11에서의 수평 연속선은 정상 혈당 한계치를 나타낸다. 이식편 회복 신장 절제술을 30일째 날에 다시 수행하였다. (E) 이식후 평균 시간-대-정상 혈당은 Tac+ AAGPTM 마우스에서 미리 당뇨병이 반전되었다는 것을 나타낸다(p < 0.001, 로그 순위의 맨틀 콕스 시험(Mantel-Cox test)). (F) 및 (G) 최종적으로, 글루코오스 내성 시험에서는 마우스가 타크로리무스(7일)를 투여 받았고, 수혜자가 CNI가 없는 경우에 Tac+에 대한 이식편 반응에서 유의한 차이를 나타냈다. 이들 차이는 Tac+ AAGPTM 그룹에서는 관측되지 않았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012]

관련 출원서의 교차 참조

[0013]

본 출원서는 2014년 06월 04일자로 출원된 미국 가출원 제 62/007,626호의 의 우선권을 주장하며, 이의 명세서는 본원에서 참고로 인용된다.

[0014]

개요

[0015]

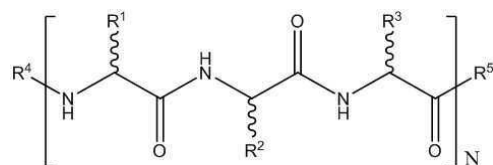
일 실시형태에 따르면, 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포(pancreatic progenitor cell) 또는 이들 두 세포의 생착(engraftment)을 증강시키기 위한 시험관 내(*in vitro*) 방법이 제공되며, 상기 시험관 내 방법은,

[0016]

a) 이식(transplantation)이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 일반 화학식 I의 겐-디플루오르화(gem-difluorination)된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다:

[0017]

일반 화학식 I



[0018]

상기 식에서, N은 1과 5 사이의 정수이고,

[0019]

R⁴는 H, AA₁ 또는 AA₁-AA₂이고,

[0020]

R⁵는 OH, AA₁ 또는 AA₁-AA₂이고,

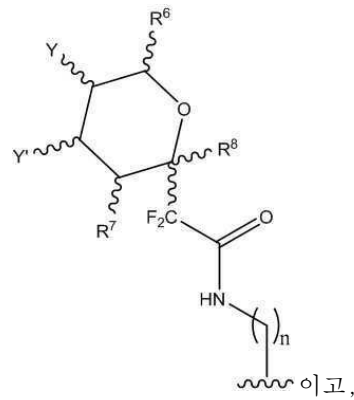
[0021]

AA₁ 및 AA₂는 독립적으로 비극성 결사슬을 갖는 아미노산을 나타내고,

[0022]

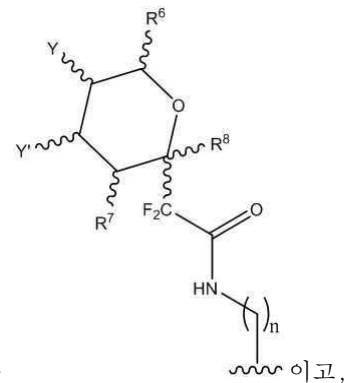
R¹, R² 및 R³은 독립적인 기이며, 이때 상기 R¹, R² 및 R³ 중 2개는 H, CH₃, CH₂Ph, CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂ 또는

[0023]



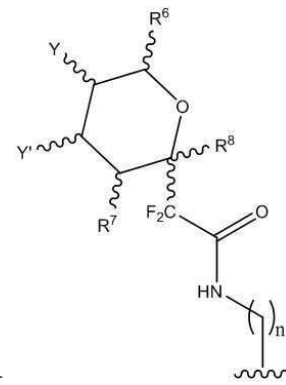
CH(CH₃)CH₂CH₃으로부터 선택되고, 상기 R¹, R² 및 R³ 중 나머지 하나는

- [0024] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,
- [0025] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N₃, NR'R'' 또는 SR'''이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,
- [0026] R' 및 R''는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, C(=O)-알킬 또는 C(=O)-Bn이고,
- [0027] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,
- [0028] R⁶은 H, CH₃, CH₂OH, CH₂-글리코시드기 또는 CH₂-OGP이며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,
- [0029] R⁷은 OH, OGP', NH₂, N₃, NHGP' 또는 NGP'GP''이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,
- [0030] R⁸은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기(alcohol function)이고,



- [0031] R¹ 및 R²가 H, CH₃, CH₂Ph, CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂ 또는 CH(CH₃)CH₂CH₃인 경우 R³은
- [0032] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,
- [0033] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N₃, NR'R'' 또는 SR'''이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,
- [0034] R' 및 R''는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, C(=O)-알킬 또는 C(=O)-Bn이고,
- [0035] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,
- [0036] R⁶은 H, CH₃, CH₂OH, CH₂-글리코시드기 또는 CH₂-OGP이며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,
- [0037] R⁷은 OH, OGP', NH₂, N₃, NHGP' 또는 NGP'GP''이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,

[0038] R^8 은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,



[0039] R^1 및 R^3 이 H, CH_3 , CH_2Ph , $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$ 또는 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 인 경우 R^2 는

[0040] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,

[0041] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N_3 , $NR'R''$ 또는 SR''' 이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,

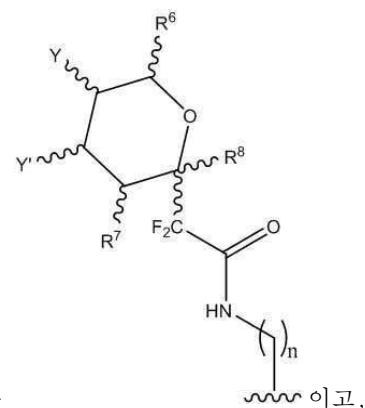
[0042] R' 및 R''는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, $C(=O)$ -알킬 또는 $C(=O)$ -Bn이고,

[0043] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,

[0044] R^6 은 H, CH_3 , CH_2OH , CH_2 -글리코시드기 또는 CH_2 -OGP이며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,

[0045] R^7 은 OH, OGP', NH_2 , N_3 , $NHGP'$ 또는 $NGP'GP''$ 이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,

[0046] R^8 은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,



[0047] R^2 및 R^3 이 H, CH_3 , $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$ 또는 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 인 경우 R^1 은

[0048] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,

[0049] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N_3 , $NR'R''$ 또는 SR''' 이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,

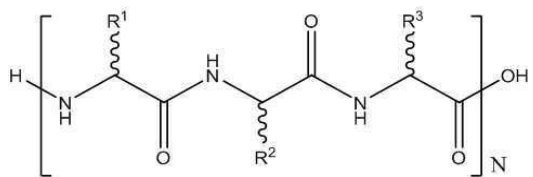
[0050] R' 및 R''는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, $C(=O)$ -알킬 또는 $C(=O)$ -Bn이고,

[0051] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,

[0052] R^6 은 H, CH_3 , CH_2OH , CH_2 -글리코시드기 또는 CH_2 -OGP이며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,

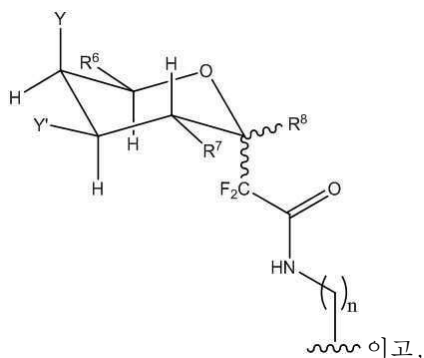
- [0053] R^7 은 OH, OGP', NH_2 , N_3 , NHGP' 또는 NGP'GP"이며, 이때 GP' 및 GP"는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,
- [0054] R^8 은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이다.
- [0055] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 베타 세포의 인슐린 분비 기능을 향상시키기 위한 시험관 내 방법이 제공되며, 상기 시험관 내 방법은,
- [0056] a) 단리된 췌장 베타 세포를 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0057] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 면역억제제 약물의 독성으로부터 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 보호하기 위한 시험관 내 방법이 제공되며, 상기 시험관 내 방법은,
- [0058] a) 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0059] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 염증 반응을 감소시키기 위한 시험관 내 방법이 제공되며, 상기 시험관 내 방법은,
- [0060] a) 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0061] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 이식하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,
- [0062] a) 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계; 및
- [0063] b) 상기 이식이 필요한 개체에 단계 a)에서 처리된 상기 단리된 췌장 세포를 이식하는 단계를 포함한다.
- [0064] 상기 방법은 상기 단계 a) 이전에 췌장 세포, 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 단리하는 단계(단계 a')를 더 포함할 수 있다. 상기 방법은 또한
- [0065] 상기 단계 b) 이전에 단계 a)에서의 상기 단리된 췌장 세포, 상기 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 면역억제제 약물과 접촉시키는 단계(단계 b')를 더 포함할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 방법에서, 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 알파 세포, 단리된 베타 세포, 단리된 델타 세포, 단리된 감마 세포, 엡실론 세포 또는 이의 조합일 수 있으며, 바람직하게는 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 베타 세포일 수 있다.
- [0067] 상기 면역억제제 약물은 다클리주맙, 시롤리무스, 타크로리무스, 사이클로스포린 또는 이의 조합 중 하나일 수 있다.
- [0068] 상기 개체는 인간 개체일 수 있다.
- [0069] 상기 단리된 췌장 세포는 생체 기증자, 시체 기증자 또는 이의 조합으로부터 단리될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 방법에서, 상기 화학식 I의 화합물은 화학식 II의 화합물일 수 있다:

[0071] 화학식 II



[0073] 상기 식에서, N은 1과 5 사이의 정수이고,

[0074] R^1 , R^2 및 R^3 은 독립적인 기이며, 이때 상기 R^1 , R^2 및 R^3 중 2개는 H 또는 CH_3 으로부터 선택되고, 상기 R^1 , R^2 및



[0075] 상기 식에서, n 은 3과 4 사이의 정수이고,

[0076] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N₃, NR'R" 또는 SR'''이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,

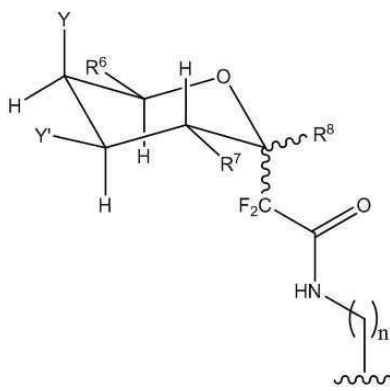
[0077] R' 및 R"는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, C(=O)-알킬 또는 C(=O)-Bn이고,

[0078] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,

[0079] R⁶은 H, CH₃, CH₂OH 또는 CH₂-OGP로부터 선택되며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,

[0080] R⁷은 OH, OGP', NH₂, N₃, NHGP' 또는 NGP'GP"이며, 이때 GP' 및 GP"는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,

[0081] R⁸은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,

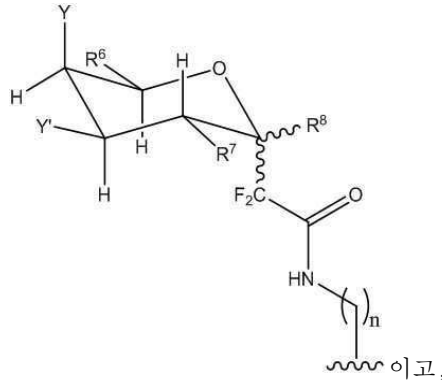


[0082] R¹ 및 R²가 H 또는 CH₃인 경우 R³은

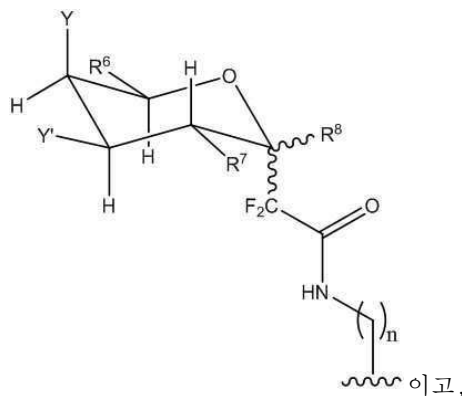
[0083] 상기 식에서, n 은 3과 4 사이의 정수이고,

[0084] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N₃, NR'R" 또는 SR'''이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,

- [0085] R' 및 R"는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, C(=O)-알킬 또는 C(=O)-Bn이고,
- [0086] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,
- [0087] R⁶은 H, CH₃, CH₂OH 또는 CH₂-OGP로부터 선택되며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,
- [0088] R⁷은 OH, OGP', NH₂, N₃, NHGP' 또는 NGP'GP"이며, 이때 GP' 및 GP"는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,
- [0089] R⁸은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,



- [0090] R¹ 및 R³이 H 또는 CH₃인 경우 R²는
- [0091] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,
- [0092] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N₃, NR'R" 또는 SR'''이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,
- [0093] R' 및 R"는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, Bn, 토실레이트기, C(=O)-알킬 또는 C(=O)-Bn이고,
- [0094] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,
- [0095] R⁶은 H, CH₃, CH₂OH 또는 CH₂-OGP로부터 선택되며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,
- [0096] R⁷은 OH, OGP', NH₂, N₃, NHGP' 또는 NGP'GP"이며, 이때 GP' 및 GP"는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,
- [0097] R⁸은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,



- [0098] R² 및 R³이 H 또는 CH₃인 경우 R¹은
- [0099] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,
- [0100] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N₃, NR'R" 또는 SR'''이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸

실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,

R' 및 R"는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, C(=O)-알킬 또는 C(=O)-Bn이고,

R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,

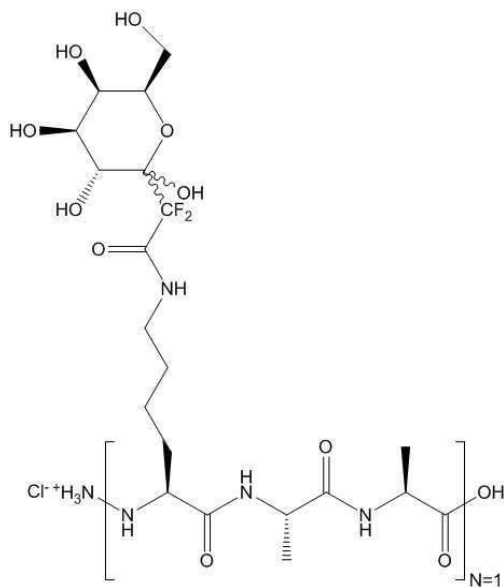
R⁶은 H, CH₃, CH₂OH 또는 CH₂-OGP로부터 선택되며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,

R⁷은 OH, OGP', NH₂, N₃, NHGP' 또는 NGP'GP"이며, 이때 GP' 및 GP"는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,

R⁸은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이다.

상기 화학식 I의 화합물은 화학식 III의 화합물일 수 있다.

화학식 III



상기 단리된 췌장 세포의 접촉은 약 0.01mg/ml 내지 약 5mg/ml 범위의 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물과 이루어질 수 있거나, 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml 범위의 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물과 이루어질 수 있다.

다른 실시형태에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포가 제공된다.

다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 이식하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,

a) 상기 이식이 필요한 개체에 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 이식하는 단계를 포함한다.

다른 실시형태에 따르면, 당뇨병을 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은,

a) 상기 이식이 필요한 개체에 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 이식하는 단계를 포함한다.

다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에 대한 이식을 위한 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 용도가 제공된다.

다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 당뇨병의 치료를 위한 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 용도가 제공된다.

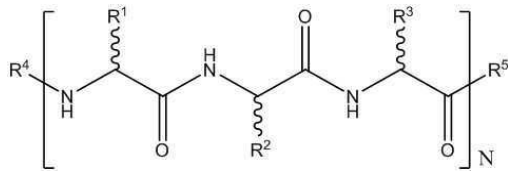
- [0117] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에 대한 이식을 위한 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포가 제공된다.
- [0118] 다른 실시형태에 따르면, 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물, 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉되는 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포가 제공된다.
- [0119] 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물은 상술한 바와 같은 화학식 II의 화합물 및/또는 상술한 바와 같은 화학식 III의 화합물일 수 있다.
- [0120] 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 알파 세포, 단리된 베타 세포, 단리된 델타 세포, 단리된 감마 세포, 엡실론 세포 또는 이의 조합일 수 있고, 바람직하게는 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 베타 세포일 수 있다.
- [0121] 상기 단리된 췌장 세포, 상기 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포는 약 0.01mg/ml 내지 약 5mg/ml 범위의 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물과 접촉하거나, 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml 범위의 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물과 접촉할 수 있다.
- [0122] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 생착을 증강시키기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물의 용도가 제공된다.
- [0123] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 베타 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 인슐린 분비 기능을 향상시키기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물의 용도가 제공된다.
- [0124] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 면역억제제 약물의 독성으로부터 단리된 췌장 베타 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 보호하기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물의 용도가 제공된다.
- [0125] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 염증 반응을 감소시키기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물의 용도가 제공된다.
- [0126] 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 알파 세포, 단리된 베타 세포, 단리된 델타 세포, 단리된 감마 세포, 엡실론 세포 또는 이의 조합일 수 있고, 바람직하게는 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 베타 세포일 수 있다.
- [0127] 상기 면역억제제 약물은 다클리주맙, 시롤리무스, 타크로리무스, 사이클로스포린 또는 이의 조합 중 하나일 수 있다.
- [0128] 상기 개체는 인간 개체일 수 있다.
- [0129] 상기 단리된 췌장 세포, 상기 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포는 생체 기증자, 시체 기증자 또는 이의 조합으로부터 단리될 수 있다.
- [0130] 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물은 상술한 바와 같은 화학식 II의 화합물 및/또는 상술한 바와 같은 화학식 III의 화합물일 수 있다.
- [0131] 상기 단리된 췌장 세포, 상기 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포는 약 0.01mg/ml 내지 약 5mg/ml 범위의 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물과 접촉하거나, 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml 범위의 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물과 접촉할 수 있다.
- [0132] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 생착을 증강시키는데 사용하기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물이 제공된다.

- [0133] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 베타 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 인슐린 분비 기능을 향상시키는데 사용하기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물이 제공된다.
- [0134] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 면역억제제 약물의 독성으로부터 단리된 췌장 베타 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 보호하는데 사용하기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물이 제공된다.
- [0135] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 염증 반응을 감소시키는데 사용하기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물이 제공된다.
- [0136] 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 알파 세포, 단리된 베타 세포, 단리된 델타 세포, 단리된 감마 세포, 엡실론 세포 또는 이의 조합일 수 있고, 바람직하게는 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 베타 세포일 수 있다.
- [0137] 상기 면역억제제 약물은 다클리주맙, 시롤리무스, 타크로리무스, 사이클로스포린 또는 이의 조합 중 하나일 수 있다.
- [0138] 상기 개체는 인간 개체일 수 있다.
- [0139] 상기 단리된 췌장 세포, 상기 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포는 생체 기증자, 시체 기증자 또는 이의 조합으로부터 단리될 수 있다.
- [0140] 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물은 상술한 바와 같은 화학식 II의 화합물 및/또는 상술한 바와 같은 화학식 III의 화합물일 수 있다.
- [0141] 상기 단리된 췌장 세포, 상기 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포는 약 0.01mg/ml 내지 약 5mg/ml 범위의 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물과 접촉하거나, 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml 범위의 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물과 접촉할 수 있다.
- [0142] 하기 용어는 후술하는 바와 같다.
- [0143] 본원에서 사용된 바와 같은 "조성물"이란 용어는 명시된 성분의 조합으로부터 명시된 양으로 직접 또는 간접적으로 생성되는 임의의 제품뿐만 아니라 명시된 성분을 명시된 양으로 포함하는 제품을 포함하는 것으로 의도된다. 약학 조성물 또는 기타 일반적인 조성물에 관한 이 같은 용어는, 임의의 2개 이상의 활성 성분(들) 및 불활성 성분(들)의 조합, 복합화(complexation) 또는 집성(aggregation), 상기 하나 이상의 성분의 해리, 또는 상기 하나 이상의 성분의 다른 유형의 반응 또는 상호작용으로부터 직접 또는 간접적으로 생성되는 임의의 제품뿐만 아니라 상기 성분들을 포함하는 제품을 포함하는 것으로 의도된다. 따라서 본 발명의 약학 조성물 또는 기타 일반적인 조성물은 본 발명의 화합물과 약학적으로 허용 가능한 담체를 혼합함으로써 제조된 임의의 조성물을 포함한다. "약학적으로 허용 가능한" 또는 "허용 가능한"이란 용어는 담체, 희석제 또는 부형제가 제형의 기타 성분과 혼화성이 있어야 하며, 이의 수혜자에 해롭지 않아야 한다는 것을 의미한다.
- [0144] "췌장 세포", "단리된 췌장 세포", "섬 세포" 또는 "단리된 섬 세포"란 용어는 생체 내(*in vivo*), 생체 외(*ex vivo*) 및/또는 시험관 내에서 성장한 췌장 기원의 세포뿐만 아니라 공지된 프로토콜을 통해 단리되고/되거나 후술한 바와 같은 생체 또는 시체 기증자로부터의 췌장의 랑게르한스섬으로부터 유래한 세포를 의미하는 것으로 의도된다. 랑게르한스섬의 세포로는 글루카곤(glucagon)이란 호르몬을 생산하고 섬 세포의 약 15 내지 20%에 해당하는 알파 세포, 인슐린 및 아밀린(amylin)이란 호르몬을 생산하고 섬 세포의 약 65 내지 80%에 해당하는 베타 세포, 소마토스타틴(somatostatin)이란 호르몬을 생산하고 섬 세포의 약 3 내지 10%에 해당하는 델타 세포, 췌장 폴리펩티드란 호르몬을 생산하고 섬 세포의 약 3 내지 5%에 해당하는 PP 세포(감마 세포로도 공지됨), 및 그렐린(ghrelin)이란 호르몬을 생산하고 섬 세포의 1% 미만에 해당하는 엡실론 세포를 들 수 있다.
- [0145] "췌장 베타 세포" 및 "단리된 췌장 베타 세포"란 용어는 생체 내, 생체 외 및/또는 시험관 내에서 성장한 췌장 기원의 베타 세포뿐만 아니라 공지된 프로토콜을 통해 단리되고/되거나 후술한 바와 같은 생체 또는 시체 기증자로부터의 췌장으로부터 유래한 세포를 의미하는 것으로 의도된다.

- [0146] "채장 선조" 및 "단리된 채장 선조"란 용어는 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내에서 자연적으로 또는 공지된 프로토콜을 통해 채장 선조 세포로 분화되어 있거나 분화되고 있는 배아 줄기세포(인간 기원 또는 기타 기원의 줄기세포)와 같은 임의의 적합한 공급원으로부터 유래한 세포를 의미하는 것으로 의도된다. 상기 단리된 채장 선조 세포는 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내에서 자연적으로 또는 공지된 프로토콜에 의한 처리에 의해 추가의 분화를 통해 채장 베타 세포가 될 잠재성을 갖는다. 예를 들어, 상기 단리된 채장 선조 세포는 분화 프로토콜을 통해 시험관 내에서 수득될 수 있으며, 분화 프로토콜을 통해 시험관 내에서 채장 베타 세포로 추가로 분화될 수 있다. 또한 상기 단리된 채장 선조 세포는 분화 프로토콜을 통해 시험관 내에서 수득될 수 있으며, 이식이 필요한 환자에 대한 주입(implantation)/이식 이후에 생체 내에서 채장 베타 세포로 추가로 분화될 수 있다.
- [0147] 알콕시 및 알카노일과 같이 "알크"란 접두사를 갖는 기타 기뿐만 아니라 "알킬"이란 용어는 탄소 사슬이 달리 정의되지 않는 한 선형 또는 분지형 및 이의 조합일 수 있는 탄소 사슬을 의미한다. 알킬기의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, sec- 및 tert-부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐 등을 들 수 있다. 탄소 원자의 명시된 개수가, 예를 들어 C₃₋₁₀로부터 허용되는 경우에 알킬이란 용어는 또한 사이클로알킬기 및 사이클로알킬 구조와 조합된 선형 또는 분지형 알킬 사슬의 조합을 포함한다. 탄소 원자의 개수가 명시되어 있지 않는 경우에는 C₁₋₆인 것으로 의도된다.
- [0148] "사이클로알킬"은 알킬의 하위집합(subset)이고, 명시된 개수의 탄소 원자를 갖는 포화 카보사이클릭 고리를 의미한다. 사이클로알킬의 예로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸, 사이클로옥틸 등을 들 수 있다. 달리 언급하지 않는 한, 사이클로알킬기는 일반적으로는 모노사이클릭형이다. 달리 언급하지 않는 한, 사이클로알킬기는 포화되어 있다.
- [0149] "알콕시"란 용어는 탄소 원자의 명시된 개수(예를 들어, C₁₋₆ 알콕시) 또는 이러한 범위 내의 임의의 개수[즉, 메톡시(MeO-), 에톡시, 이소프로폭시 등]를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알콕시드를 지칭한다.
- [0150] "알킬티오"란 용어는 탄소 원자의 명시된 개수(예를 들어, C₁₋₆ 알킬티오) 또는 이러한 범위 내의 임의의 개수[즉, 메틸티오(MeS-), 에틸티오, 이소프로필티오 등]를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬설파이드를 지칭한다.
- [0151] "알킬아미노"란 용어는 탄소 원자의 명시된 개수(예를 들어, C₁₋₆ 알킬아미노) 또는 이러한 범위 내의 임의의 개수[즉, 메틸아미노, 에틸아미노, 이소프로필아미노, t-부틸아미노 등]를 갖는 직쇄 또는 분지형 알킬아민을 지칭한다.
- [0152] "알킬설포닐"이란 용어는 탄소 원자의 명시된 개수(예를 들어, C₁₋₆ 알킬설포닐) 또는 이러한 범위 내의 임의의 개수[즉, 메틸설포닐(MeSO₂-), 에틸설포닐, 이소프로필설포닐 등]를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬설포닐을 지칭한다.
- [0153] "알킬설피닐"이란 용어는 탄소 원자의 명시된 개수(예를 들어, C₁₋₆ 알킬설피닐) 또는 이러한 범위 내의 임의의 개수[즉, 메틸설피닐(MeSO-), 에틸설피닐, 이소프로필설피닐 등]를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬설피록사이드를 지칭한다.
- [0154] "알킬옥시카르보닐"이란 용어는 탄소 원자의 명시된 개수(예를 들어, C₁₋₆ 알킬옥시카르보닐) 또는 이러한 범위 내의 임의의 개수[즉, 메틸옥시카르보닐 (MeOCO-), 에틸옥시카르보닐 또는 부틸옥시카르보닐]를 갖는 본 발명의 카르복실산 유도체의 직쇄 또는 분지쇄 에스테르를 지칭한다.
- [0155] "아릴"은 탄소 고리 원자를 함유하는 모노사이클릭 또는 폴리사이클릭 방향족 고리 시스템을 의미한다. 바람직한 아릴은 모노사이클릭 또는 바이사이클릭 6원 내지 10원 방향족 고리 시스템이다. 페닐 및 나프틸이 바람직한 아릴이다. 가장 바람직한 아릴은 페닐이다.
- [0156] "헤테로사이클"은 O, S 및 N으로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 함유하고 황의 산화된 형태, 즉 SO 및 SO₂를 더 포함하는 포화 또는 불포화 비-방향족 고리 또는 고리 시스템을 지칭한다. 헤테로사이클의 예로는 테트라하이드로퓨란(THF), 디하이드로퓨란, 1,4-디옥산, 모르폴린, 1,4-디티안(1,4-dithiane), 피페라진, 피페리딘, 1,3-디옥솔란, 이미다졸리딘, 이미다졸린, 피롤린, 피롤리딘, 테트라하이드로피란, 디하이드로피란, 옥사티올란, 디티올란, 1,3-디옥산, 1,3-디티안, 옥사티안, 티오모르폴린, 2-옥소피페리딘-1-일, 2-옥소피롤리딘-1-일, 2-옥소아제티딘-1-일, 1,2,4-옥사디아진-5(6H)-온-3-일 등을 들 수 있다.

- [0157] "헤테로아릴"은 O, S 및 N으로부터 선택된 적어도 하나의 고리 헤테로원자를 함유하는 방향족 또는 부분 방향족 헤테로사이클을 의미한다. 따라서 헤테로아릴은 방향족이 아닌 아릴, 사이클로알킬 및 헤테로사이클과 같이 기타 종류의 고리에 융합된 헤테로아릴을 포함한다. 헤테로아릴기의 예로는 피롤일, 이소옥사졸일, 이소티아졸일, 피라졸일, 피리딘, 옥사졸일, 옥사디아졸일(특히, 1,3,4-옥사디아졸-2-일 및 1,2,4-옥사디아졸-3-일), 티아디아졸일, 티아졸일, 이미다졸일, 트리아졸일, 테트라졸일, 퓨릴, 트리아진일, 티엔일, 피리미딜, 벤즈이소옥사졸일, 벤즈옥사졸일, 벤조티아졸일, 벤조티아디아졸일, 디하이드로벤조퓨란일, 인돌린일, 피리다진일, 인다졸일, 이소인돌일, 디하이드로벤조티엔일, 인돌리진일, 시놀린일(cinnoliny), 프탈라진일, 퀴나졸린일, 나프티리딘일, 카바졸일, 벤조디옥솔일, 퀴놀살린일, 푸린일, 퓨라잔일, 이소벤질퓨란일, 벤즈이미다졸일, 벤조퓨란일, 벤조티엔일, 퀴놀일, 인돌일, 이소퀴놀일, 디벤조퓨란일 등을 들 수 있다. 헤테로사이클일 및 헤테로아릴기에 있어서, 3 내지 15개의 원자를 함유한 고리 및 고리 시스템이 포함되며, 이들 원자는 1 내지 3개의 고리를 형성한다.
- [0158] "할로겐"은 불소, 염소, 브롬 및 요오드를 지칭한다. 염소 및 불소는 일반적으로 바람직하다. 알킬기 또는 알콕시기(예를 들어, CF₃O 및 CF₃CH₂O) 상에서 할로겐이 치환되는 경우에 불소가 가장 바람직하다.
- [0159] 본 발명을 상세하게 설명하기 전에 다수의 용어가 정의될 것이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 문맥에서 달리 명백하게 나타내지 않는 한 단수 형태는 복수의 참고 대상을 포함한다.
- [0160] "바람직하게", "보통", 및 "전형적으로"와 같은 용어는 청구된 발명의 범주를 제한하기 위해 본원에서 사용되지 않으며, 특정한 특징이 청구된 발명의 구조 또는 기능에 필요하거나 본질적이거나, 심지어는 이에 중요하다는 것을 내포하기 위해 본원에서 사용되지 않는 것으로 주지된다. 오히려 이들 용어는 단순히 본 발명의 특정 실시 형태에서 사용되거나 사용될 수 없는 대안적이거나 부가적인 특징을 강조하는 것으로 의도된다.
- [0161] 본 발명의 설명하고 한정할 목적으로, "실질적으로"란 용어는 임의의 정량적인 비교, 값, 측정 또는 기타 표현에 기인할 수 있는 고유의 불확실성 정도를 나타내기 위해 본원에서 이용되는 것으로 주지된다. "실질적으로"란 용어는 또한 계류 중인 청구 주제의 기본적인 기능에서의 변화를 초래하지 않으면서 언급된 인용문헌으로부터 정량적 표현이 변경될 수 있는 정도를 나타내기 위해 본원에서 이용된다.
- [0162] 본 발명의 청구 주제의 특징 및 이점은, 첨부된 도면에서 예시된 바와 같이 하기의 선택된 실시형태의 상세한 설명의 견지에서 더욱 자명하게 될 것이다. 구현되는 바와 같이, 개시되고 청구된 청구 주제는 모두가 특허청구 범위의 범주에서 벗어나지 않는 한 다양한 측면에서 변경될 수 있다. 따라서 도면 및 설명은 본질적으로 예시적인 것으로 간주되지만 제한적인 것으로 간주되어서는 아니 되며, 청구 주제의 전체 범위는 특허청구범위에 개시되어 있다.
- [0163] 상세한 설명
- [0164] 베타 세포 이식은 기증자 채장으로부터 다른 사람으로의 단리된 베타 섬 세포의 이식이다. 이는 1형 진성 당뇨병에 대한 실험적 치료이다. 일단 이식되면, 베타 섬 세포는 인슐린을 생성하기 시작하여, 활성적으로 혈액 중의 글루코오스 수준을 조절한다. 섬은 통상 환자의 간 내로 주입된다. 세포가 유전적으로 동일한 기증자로부터 유래하지 않는 경우, 환자의 신체는 이들을 이물질로서 인식할 것이고, 면역 시스템은 임의의 이식 거부 반응으로서 이들을 공격하기 시작할 것이다. 이를 예방하기 위해 면역억제제 약물이 사용된다. 섬 이식 분야에서 유일한 진전이 이루어졌을지라도 현재 이의 광범위한 적용을 가로막는 많은 장애가 존재한다. 2개의 가장 중요한 제약으로는 섬 거부반응을 방지하기 위한 현재 수단의 부적절성 및 이식을 위한 베타 섬 세포의 공급의 제한이 있다. 현재의 면역억제 요법들은 수개월 내지 수년 동안 베타 섬 세포의 부전을 예방할 수 있지만, 이들 치료에 사용된 약제들은 고가이며, 특정 악성 종양 및 기회감염에 대한 위험성을 증가시킬 수 있다. 게다가 다소 반어적으로는, 가장 일반적으로 사용되는 약제(다클리주맙(Zenapax™), 시롤리무스(Rapamune™), 사이클로스포린 및 타크로리무스(Prograf™)를 포함함)들은 또한 정상적인 베타 섬 세포의 기능 및/또는 인슐린 작용을 손상시키는 것으로 공지되어 있다.
- [0165] 제 1 실시형태에서, 단리된 채장 세포, 단리된 채장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 생착을 증강시키기 위한 시험관 내 방법이 개시되어 있으며, 상기 시험관 내 방법은,
- [0166] a) 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 채장 세포, 단리된 채장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다:

[0167] 일반 화학식 I



[0168]

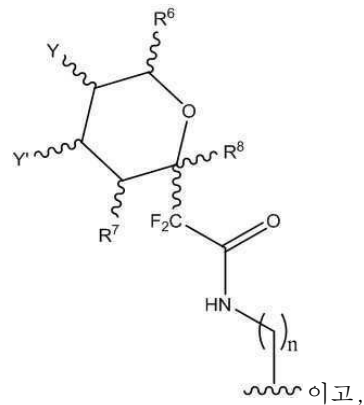
[0169] 상기 식에서, N은 1과 5 사이의 정수이고,

[0170] R⁴는 H, AA₁ 또는 AA₁-AA₂이고,

[0171] R⁵는 OH, AA₁ 또는 AA₁-AA₂이고,

[0172] AA₁ 및 AA₂는 독립적으로 비극성 결사슬을 갖는 아미노산을 나타내고,

[0173] R¹, R² 및 R³은 독립적인 기이며, 이때 상기 R¹, R² 및 R³ 중 2개는 H, CH₃, CH₂Ph, CH(CH₃)₂, CH₂CH(CH₃)₂ 또는



CH(CH₃)CH₂CH₃으로부터 선택되고, 상기 R¹, R² 및 R³ 중 나머지 하나는

[0174] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,

[0175] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N₃, NR'R'' 또는 SR'''이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,

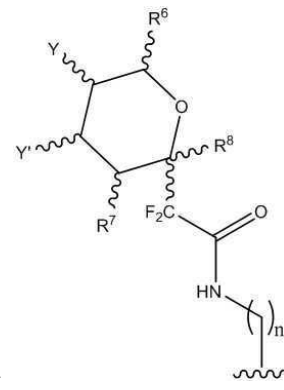
[0176] R' 및 R''는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, C(=O)-알킬 또는 C(=O)-Bn이고,

[0177] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,

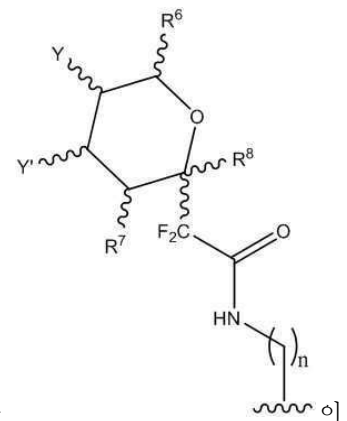
[0178] R⁶은 H, CH₃, CH₂OH, CH₂-글리코시드기 또는 CH₂-OGP이며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,

[0179] R⁷은 OH, OGP', NH₂, N₃, NHGP' 또는 NGP'GP''이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,

[0180] R⁸은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,



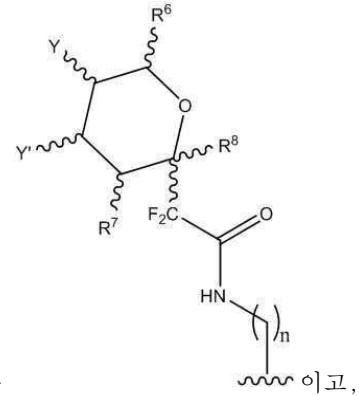
- [0181] R^1 및 R^2 가 H, CH_3 , CH_2Ph , $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$ 또는 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 인 경우 R^3 은
- [0182] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,
- [0183] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N_3 , $NR'R''$ 또는 SR''' 이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,
- [0184] R' 및 R''는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, C(=O)-알킬 또는 C(=O)-Bn이고,
- [0185] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,
- [0186] R^6 은 H, CH_3 , CH_2OH , CH_2 -글리코시드기 또는 CH_2 -OGP이며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,
- [0187] R^7 은 OH, OGP', NH_2 , N_3 , NHGP' 또는 NGP'GP''이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,
- [0188] R^8 은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,



- [0189] R^1 및 R^3 이 H, CH_3 , CH_2Ph , $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$ 또는 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 인 경우 R^2 은
- [0190] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,
- [0191] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N_3 , $NR'R''$ 또는 SR''' 이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,
- [0192] R' 및 R''는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, C(=O)-알킬 또는 C(=O)-Bn이고,
- [0193] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,
- [0194] R^6 은 H, CH_3 , CH_2OH , CH_2 -글리코시드기 또는 CH_2 -OGP이며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,
- [0195] R^7 은 OH, OGP', NH_2 , N_3 , NHGP' 또는 NGP'GP''이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실

릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,

[0196] R^8 은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,



[0197] R^2 및 R^3 이 H, CH_3 , $CH(CH_3)_2$, $CH_2CH(CH_3)_2$ 또는 $CH(CH_3)CH_2CH_3$ 인 경우 R^1 은

[0198] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,

[0199] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N_3 , $NR'R''$ 또는 SR''' 이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,

[0200] R' 및 R''는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, $C(=O)$ -알킬 또는 $C(=O)$ -Bn이고,

[0201] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,

[0202] R^6 은 H, CH_3 , CH_2OH , CH_2 -글리코시드기 또는 CH_2 -OGP이며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,

[0203] R^7 은 OH, OGP', NH_2 , N_3 , $NHGP'$ 또는 $NGP'GP''$ 이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,

[0204] R^8 은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이다.

[0205] 제 2 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 베타 세포의 인슐린 분비 기능을 향상시키기 위한 시험관 내 방법이 개시되어 있으며, 상기 시험관 내 방법은,

[0206] a) 단리된 췌장 베타 세포를 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 췌-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0207] 제 3 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 면역억제제 약물의 독성으로부터 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 보호하기 위한 시험관 내 방법이 개시되어 있으며, 상기 시험관 내 방법은,

[0208] a) 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 췌-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

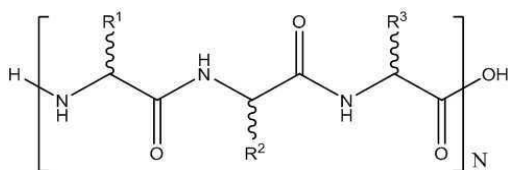
[0209] 제 4 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 염증 반응을 감소시키기 위한 시험관 내 방법이 개시되어 있으며, 상기 시험관 내 방법은,

[0210] a) 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 췌-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

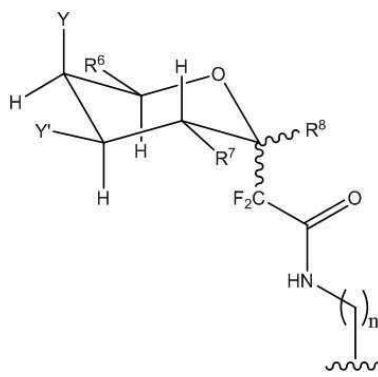
[0211] 제 4 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 이식하는 방법이 개시되어 있으며, 상기 방법은,

- [0212] a) 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 쥬-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉시키는 단계; 및
- [0213] b) 상기 이식이 필요한 개체에 단계 a)에서 처리된 상기 단리된 췌장 세포를 이식하는 단계를 포함한다.
- [0214] 일 실시형태에 따르면, 본 발명의 이식 방법은 상기 단계 a) 이전에 췌장 세포, 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 단리하는 단계(단계 a')를 더 포함할 수 있다.
- [0215] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명의 이식 방법은 또한 상기 단계 b) 이전에 단계 a)에서의 상기 단리된 췌장 세포, 상기 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 면역억제제 약물과 접촉시키는 단계(단계 b')를 더 포함할 수 있다.
- [0216] 실시형태에서, 이식 절차는 현재의 세포 유형에 적절히 적용할 수 있는 미래의 이식 절차뿐만 아니라 임의의 공지되고 적합한 이식 절차에 따라 수행될 수 있다. 일 실시형태에 따르면, 상기 이식 절차는 "에드먼턴(Edmonton) 프로토콜"일 수 있다. "에드먼턴 프로토콜"로서 공지된 췌장 세포 이식 절차는 환자의 간문맥 내로 시체의 췌장 세포의 이식을 포함한다. 이식의 동종 특성으로 인해 타크로리무스와 같은 칼시뉴린(calcineurin) 억제제의 사용을 통한 면역 억제제가 적용된다. 이식된 세포가 무혈관이거나 심각한 스트레스를 받고 있는 생착 과정 도중에는 이식 후 기간이 존재하며, 이러한 기간 도중에는 이식이 실패할 가능성이 있다. 신피 캡슐(sub renal capsule) 및 피하(sub dermal)를 포함한 이식을 위한 기타 부위가 이렇게 사용되어 왔다. 실시형태에 따르면, 췌장 또는 베타 선조 세포 이식의 경우에 목적하는 효과를 달성하기 위해 다수의 세포가 요구되기 때문에 주요 이식 부위는 여전히 간문맥이다.
- [0217] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명의 방법에서, 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 알파 세포, 단리된 베타 세포, 단리된 델타 세포, 단리된 감마 세포, 엡실론 세포 또는 이의 조합일 수 있으며, 바람직하게는 단리된 췌장 세포는 단리된 베타 세포이다.
- [0218] 상술한 본 발명의 방법에서, 상기 면역억제제 약물은 다클리주맙, 시롤리무스, 타크로리무스, 사이클로스포린 또는 이의 조합 중 하나일 수 있다.
- [0219] 실시형태에 따르면, 상기 개체는 인간 개체일 수 있고, 상기 단리된 췌장 세포는 생체 기증자, 시체 기증자 또는 이의 조합으로부터 단리될 수 있다.
- [0220] 일 실시형태에 따르면, 상기 일반 화학식 I의 쥬-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물은 일반 화학식 II의 화합물일 수 있다:

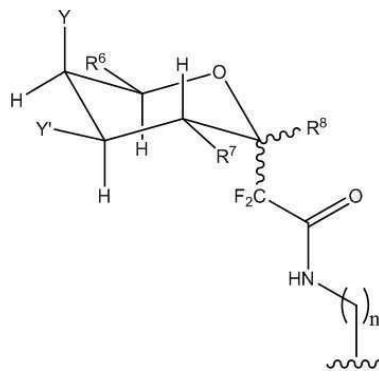
[0221] 일반 화학식 II



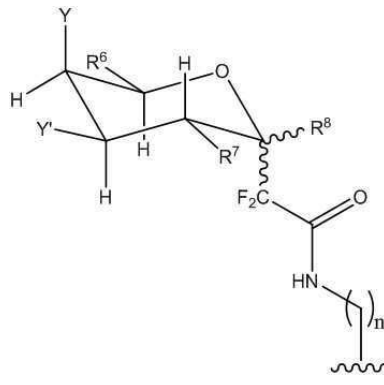
- [0222] 상기 식에서, N은 1과 5 사이의 정수이고,
- [0223] 상기 식에서, N은 1과 5 사이의 정수이고,
- [0224] R^1 , R^2 및 R^3 은 독립적인 기이며, 이때 상기 R^1 , R^2 및 R^3 중 2개는 H 또는 CH_3 으로부터 선택되고, 상기 R^1 , R^2 및



- [0225] 상기 식에서, n 은 3과 4 사이의 정수이고,
- [0226] Y 및 Y' 는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y' 는 H, OR, N_3 , $NR'R''$ 또는 SR''' 이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,
- [0227] R' 및 R'' 는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, $C(=O)$ -알킬 또는 $C(=O)$ -Bn이고,
- [0228] R''' 는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,
- [0229] R^6 은 H, CH_3 , CH_2OH 또는 CH_2 -OGP로부터 선택되며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,
- [0230] R^7 은 OH, OGP', NH_2 , N_3 , NHGP' 또는 NGP'GP''이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,
- [0231] R^8 은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,



- [0232] R^1 및 R^2 가 H 또는 CH_3 인 경우 R^3 은
- [0233] 상기 식에서, n 은 3과 4 사이의 정수이고,
- [0234] Y 및 Y' 는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y' 는 H, OR, N_3 , $NR'R''$ 또는 SR''' 이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,
- [0235] R' 및 R'' 는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, $C(=O)$ -알킬 또는 $C(=O)$ -Bn이고,
- [0236] R''' 는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,
- [0237] R^6 은 H, CH_3 , CH_2OH 또는 CH_2 -OGP로부터 선택되며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,
- [0238] R^7 은 OH, OGP', NH_2 , N_3 , NHGP' 또는 NGP'GP''이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,
- [0239] R^8 은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,



[0240] R^1 및 R^3 이 H 또는 CH_3 인 경우 R^2 는

[0241] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,

[0242] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N_3 , $NR'R''$ 또는 SR''' 이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,

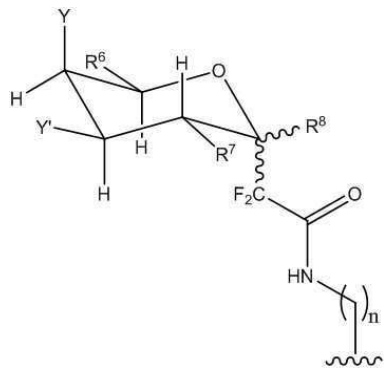
[0243] R' 및 R''는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, Bn, 토실레이트기, $C(=O)$ -알킬 또는 $C(=O)$ -Bn이고,

[0244] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,

[0245] R^6 은 H, CH_3 , CH_2OH 또는 CH_2 -OGP로부터 선택되며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,

[0246] R^7 은 OH, OGP', NH_2 , N_3 , NHGP' 또는 NGP'GP''이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,

[0247] R^8 은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이고,



[0248] R^2 및 R^3 이 H 또는 CH_3 인 경우 R^1 은

[0249] 상기 식에서, n은 3과 4 사이의 정수이고,

[0250] Y 및 Y'는 독립적인 기이며, 이때 Y 및 Y'는 H, OR, N_3 , $NR'R''$ 또는 SR''' 이고, 여기서 R은 H, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기이고,

[0251] R' 및 R''는 독립적으로 H, 알킬기, 알릴기, 벤질기, 토실레이트기, $C(=O)$ -알킬 또는 $C(=O)$ -Bn이고,

[0252] R'''는 H, 알킬기 또는 아세테이트기이고,

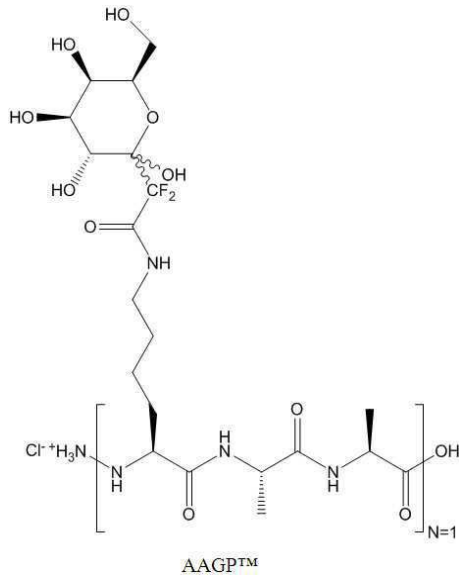
[0253] R^6 은 H, CH_3 , CH_2OH 또는 CH_2 -OGP로부터 선택되며, 이때 GP는 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택된 보호기이고,

[0254] R^7 은 OH, OGP', NH_2 , N_3 , NHGP' 또는 NGP'GP''이며, 이때 GP' 및 GP''는 독립적으로 알킬기, 벤질기, 트리메틸실릴기, tert-부틸디메틸실릴기, tert-부틸디페닐실릴기 또는 아세테이트기로부터 선택되고,

[0255] R^8 은 수소 원자(H) 또는 유리 또는 보호 알코올 작용기이다.

[0256] 다른 실시형태에 따르면, 일반 화학식 I의 바람직한 쥬-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물은 AAGPTM으로도 명명된 화학식 III의 화합물이다:

[0257] 화학식 III



[0258]

[0259] 다른 실시형태에 따르면, 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포가 개시되어 있다.

[0260] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 이식하는 방법이 개시되어 있으며, 상기 방법은,

[0261] a) 상기 이식이 필요한 개체에 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 이식하는 단계를 포함한다.

[0262] 다른 실시형태에 따르면, 당뇨병을 치료하는 방법이 개시되어 있으며, 상기 방법은,

[0263] a) 상기 이식이 필요한 개체에 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 이식하는 단계를 포함한다.

[0264] 다른 실시형태에 따르면, 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 알파 세포, 단리된 베타 세포, 단리된 델타 세포, 단리된 감마 세포, 엡실론 세포 또는 이의 조합일 수 있으며, 바람직하게는 단리된 췌장 세포는 단리된 베타 세포이다.

[0265] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에 대한 이식을 위한 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 용도가 개시되어 있다.

[0266] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 당뇨병의 치료를 위한 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 용도가 개시되어 있다.

[0267] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에 대한 이식을 위한 본 발명의 방법에 따라 제조된 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포가 개시되어 있다.

[0268] 다른 실시형태에 따르면, 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 알파 세포, 단리된 베타 세포, 단리된 델타 세포, 단리된 감마 세포, 엡실론 세포 또는 이의 조합일 수 있으며, 바람직하게는 단리된 췌장 세포는 단리된 베타 세포이다.

[0269] 다른 실시형태에 따르면, 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 쥬-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상기 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물과 접촉되는 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포가 개시되어 있다.

- [0270] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 생착을 증강시키기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물의 용도가 개시되어 있다.
- [0271] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 베타 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 인슐린 분비 기능을 향상시키기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물의 용도가 개시되어 있다.
- [0272] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 면역억제제 약물의 독성으로부터 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 보호하기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물의 용도가 개시되어 있다.
- [0273] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 염증 반응을 감소시키기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물의 용도가 개시되어 있다.
- [0274] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 생착을 증강시키는데 사용하기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물이 개시되어 있다.
- [0275] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 베타 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 인슐린 분비 기능을 향상시키는데 사용하기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물이 개시되어 있다.
- [0276] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 면역억제제 약물의 독성으로부터 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포를 보호하는데 사용하기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물이 개시되어 있다.
- [0277] 다른 실시형태에 따르면, 이식이 필요한 개체에서 이식 이전에 단리된 췌장 세포, 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포의 염증 반응을 감소시키는데 사용하기 위한 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 켄-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물 또는 상술한 바와 같은 일반 화학식 I의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염기, 산으로 첨가 염, 수화물 또는 용매 화합물의 용도가 개시되어 있다.
- [0278] 다른 실시형태에 따르면, 상기 화학식 I의 화합물은 화학식 II의 화합물 및/또는 화학식 III의 화합물일 수 있다.
- [0279] 다른 실시형태에 따르면, 상기 단리된 췌장 세포, 상기 단리된 췌장 선조 세포 또는 이들 두 세포는 약 0.01mg/ml 내지 약 5mg/ml 범위의 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물과 접촉하거나, 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml 범위의 상기 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물과 접촉할 수 있다.
- [0280] 상술한 본 발명의 용도에서, 상기 면역억제제 약물은 다클리주맙, 시롤리무스, 타크로리무스, 사이클로스포린 또는 이의 조합 중 하나일 수 있다.
- [0281] 상술한 용도 및 화합물에 따르면, 상기 개체는 인간 개체일 수 있고, 상기 단리된 췌장 세포는 생체 기증자, 시체 기증자 또는 이의 조합으로부터 단리될 수 있다.
- [0282] 다른 실시형태에 따르면, 상기 단리된 췌장 세포는 단리된 알파 세포, 단리된 베타 세포, 단리된 델타 세포, 단리된 감마 세포, 엡실론 세포 또는 이의 조합일 수 있으며, 바람직하게는 단리된 췌장 세포는 단리된 베타 세포이다.
- [0283] 본 발명은 도식된 바와 같은 화합물을 포함하며, 또한 (가능한 경우) 상기 화합물의 개개의 부분입체 이성질체,

거울상 이성질체 및 에피머(epimer), 및 이의 부분입체 이성질체 및/또는 거울상 이성질체의 혼합물(라세미 혼합물을 포함함)을 포함한다. 본원에 개시된 특정 입체 화학(stereochemistry)이 바람직할지라도 부분입체 이성질체, 거울상 이성질체, 에피머 및 이들의 혼합물을 포함한 기타 입체 이성질체가 또한 유용할 수 있다. 불활성 이거나 덜 활성인 부분입체 이성질체 및 거울상 이성질체가 표적 및/또는 활성화 기작에 관한 과학적 연구에 유용하다.

[0284] 본원에 개시된 화합물은 (a) 상기 화합물(들) 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 (b) 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 사용될 수 있다. 상기 화합물은 하나 이상의 기타 약학적 유효 성분을 포함하는 약학 조성물에 사용될 수 있다. 상기 화합물은 또한 화학식 I, 화학식 II 또는 화학식 III의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 유일한 활성 성분인 약학 조성물에 사용될 수 있다.

[0285] 구조 화학식 I, 구조 화학식 II 및/또는 구조 화학식 III의 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심을 함유할 수 있으며, 따라서 라세미 화합물 및 라세미 혼합물, 단일 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체성 혼합물 및 개개의 부분입체 이성질체로서 나타날 수 있다. 본 발명은 구조 화학식 I, 구조 화학식 II 및/또는 구조 화학식 III의 화합물의 이 같은 이성질체 형태 모두를 포함한다는 것을 의미한다.

[0286] 구조 화학식 I, 구조 화학식 II 및/또는 구조 화학식 III의 화합물은, 예를 들어 적합한 용매, 예를 들어 메탄올 또는 에틸 아세테이트 또는 이의 혼합물로부터의 분별 결정화(fractional crystallization)에 의해 이들의 개개의 부분입체 이성질체로 분리될 수 있거나, 광학적 활성 고정상을 이용하는 키랄 크로마토그래피를 통해 분리될 수 있다. 절대 입체화학은, 필요한 경우에 공지된 절대 배열의 비대칭 중심을 함유한 시약에 의해 유도체화 되는 결정성 생성물 또는 결정성 중간체의 X선 결정학에 의해 결정될 수 있다.

[0287] 대안적으로는, 일반 구조 화학식 I, 구조 화학식 II 및/또는 구조 화학식 III의 화합물의 임의의 입체 이성질체는 광학적으로 순수한 출발 물질 또는 공지된 절대 배열을 갖는 시약을 이용하여 입체 특이적 합성에 의해 수득될 수 있다.

[0288] 필요한 경우, 상기 화합물의 라세미 혼합물은 개개의 거울상 이성질체가 단리되도록 분리될 수 있다. 상기 분리, 화합물의 라세미 혼합물을 거울상 이성질체적으로 순수한 화합물에 결합하여 부분입체 이성질체성 혼합물을 형성한 후 분별 결정화 또는 크로마토그래피와 같은 표준 방법에 의해 개개의 부분입체 이성질체를 분리하는 것과 같이 당해 기술분야에 널리 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 상기 결합 반응은 종종 거울상 이성질체적으로 순수한 산 또는 염기를 이용하여 염을 형성하는 것이다. 이어 상기 부분입체 이성질체성 유도체는 부가된 키랄 잔기의 개입에 의해 순수한 거울상 이성질체로 전환될 수 있다. 상기 화합물의 라세미 혼합물은 또한 키랄 고정상을 이용하는 크로마토그래피 방법에 의해 직접 분리될 수 있으며, 이러한 방법은 당해 기술분야에 널리 공지되어 있다.

[0289] 본원에 개시된 화합물들 중 일부는 올레핀성 이중결합을 함유하며, 달리 언급하지 않는 한 E 및 Z 기하 이성질체 둘 모두를 포함한다는 것을 의미한다.

[0290] 본원에 개시된 화합물들 중 일부는 하나 이상의 이중결합 이동에 의해 달성되는 상이한 수소 부착점을 갖는 토토머(tautomer)로서 존재할 수 있다. 예를 들어, 케톤 및 이의 엔올은 케토-엔올 토토머를 형성한다. 개개의 토토머 및 이의 혼합물은 본 발명의 화합물과 함께 포함된다.

[0291] 일반 화학식 I, 화학식 II 및/또는 화학식 III의 화합물에서, 원자는 이들의 천연의 동위원소 존재비(isotopic abundance)를 나타낼 수 있거나, 상기 하나 이상의 원자는 동일한 원자 번호를 갖지만 자연에서 주로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와는 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 특정 동위원소에서 인위적으로 풍부할 수 있다. 본 발명은 일반 화학식 I, 화학식 II 및/또는 화학식 III의 화합물의 모든 적합한 동위원소 변형을 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 수소(H)의 상이한 동위원소 형태로는 프로튬(protium; ^1H) 및 듀테륨(deuterium; ^2H)을 들 수 있다. 프로튬은 자연에서 발견되는 우세한 수소 동위원소이다. 듀테륨에 대한 농축은 생체 내 반감기를 증가시키거나 투여량 요건을 감소시키는 것과 같이 특정 치료 이점을 제공할 수 있거나, 생물학적 샘플의 특성화를 위한 표준으로서 유용한 화합물을 제공할 수 있다. 일반 화학식 I, 화학식 II 및/또는 화학식 III 내에서 동위원소적으로 풍부한 화합물은 당해 기술분야의 숙련자에게 널리 공지된 통상의 기법에 의해 과도한 실험 없이 제조될 수 있다.

[0292] **염 및 제형**

[0293] 본원에서 사용된 바와 같이, 구조 화학식 I, 화학식 II 및/또는 화학식 III의 화합물에 대한 참조는 또한 약학

적으로 허용 가능한 염, 및 이들이 유리 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염에서 전구체로서 사용되거나 기타 합성 조작에 사용되는 경우에 약학적으로 허용할 수 없는 염을 포함한다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. "약학적으로 허용 가능한 염"이란 용어는 무기 염기 또는 유기 염기 및 무기산 또는 유기산을 포함한 약학적으로 허용 가능한 비독성 염기 또는 산으로부터 제조된 염을 지칭한다. "약학적으로 허용 가능한 염"이란 용어 내에 포함된 염기성 화합물의 염은 유리 염기를 적합한 유기 또는 무기산과 반응시킴으로써 일반적으로 제조되는 본 발명의 화합물의 비독성 염을 지칭한다. 본 발명의 염기성 화합물의 대표적인 염으로는 아세테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이카보네이트, 바이설페이트, 바이타르트레이트, 보레이트, 브로마이드, 캄실레이트(camsylate), 카보네이트, 클로라이드, 클라불라네이트(clavulanate), 시트레이트, 에데테이트(edetate), 에디실레이트(edisylate), 에스톨레이트(estolate), 에실레이트(esylate), 푸마레이트, 글루셉테이트(glucaptate), 글루코네이트, 글루타메이트, 헥실레스오시네이트(hexylresorcinate), 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드록시나프탈레이트, 요오다이드, 이소티오네이트, 락테이트, 락토비오네이트(lactobionate), 라우레이트, 말레이트, 말리에이트, 만델레이트(mandelate), 메실레이트(mesylate), 메틸브로마이드, 메틸니트레이트, 메틸설페이트, 뮤케이트(mucate), 납실레이트(napsylate), 니트레이트, N-메틸글루카민 암모늄 염, 올리에이트, 옥살레이트, 파모에이트(엠보네이트(embonate)), 팔미테이트, 판토테네이트(pantothenate), 포스페이트/디포스페이트, 폴리갈락투로네이트(polygalacturonate), 살리실레이트, 스테아레이트, 설페이트, 서브아세테이트(subacetate), 숙시네이트, 타네이트(tannate), 타르트레이트, 테오클레이트(teoclolate), 토실레이트, 트리에티오다이드(triethiodide) 및 발레레이트(valerate)를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 또한 본 발명의 화합물이 산성 일부를 갖고 있는 경우, 이의 적합한 약학적으로 허용 가능한 염으로는 알루미늄, 암모늄, 칼슘, 구리, 제2철, 제1철, 리튬, 마그네슘, 3가 망간, 2가 망간, 칼륨, 나트륨, 아연 등을 포함하는 무기 염기로부터 유래한 염을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 칼륨 및 나트륨 염이 특히 바람직하다. 약학적으로 허용 가능한 비독성의 유기 염기로부터 유래한 염으로는 아르기닌, 베타인, 카페인, 콜린, N,N-디벤질에틸렌디아민, 디에틸아민, 2-디에틸아미노에탄올, 2-디메틸아미노에탄올, 에탄올아민, 에틸렌디아민, N-에틸모르폴린, N-에틸피페리딘, 글루카민, 글루코사민, 히스티딘, 이소프로필아민, 리신, 메틸글루카민, 모르폴린, 피페라진, 피페리딘, 폴리아민 수지, 프로카인, 푸린, 테오브로민(theobromine), 트리에틸아민, 트리메틸아민, 트리프로필아민, 트로메타민(tromethamine) 등과 같은 1차, 2차 및 3차 아민, 사이클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지의 염을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0294] 또한 본 발명의 화합물에 존재하는 카르복실산(-COOH) 또는 알코올기의 경우에 메틸, 에틸 또는 피발로일옥시메틸과 같은 카르복실산 유도체, 또는 아세틸, 피발로일, 벤조일 및 아미노아실과 같은 알코올의 아실 유도체의 약학적으로 허용 가능한 에스테르가 이용될 수 있다. 서방형 제형 또는 프로드러그(prodrug) 제형으로서 사용하기 위해 용해성 또는 가수분해 특성을 개질하기 위한 당해 기술분야에 공지된 이들 에스테르 및 아실기가 포함된다.

[0295] 상기 구조 화학식 I, 화학식 II 및/또는 화학식 III의 화합물의 용매 화합물, 특히 수화물이 또한 본 발명에 포함된다.

[0296] 일 실시형태에 따르면, 상기 구조 화학식 I, 화학식 II 및/또는 화학식 III의 화합물은 약제로서 사용하기 위한 다양한 제형에 포함될 수 있다.

[0297] 수성 현탁액은 수성 현탁액의 제조에 적합한 부형제와의 혼합물 중에 활성 물질을 함유한다. 이 같은 부형제는 현탁제, 예를 들어 나트륨 카복시메틸-셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스, 알긴산 나트륨, 폴리비닐-피롤리돈, 트라가칸트검 및 아라비아고무 등이 있고, 분산제 또는 습윤제는 자연적으로 발생하는 포스파티드, 예를 들어 레시틴일 수 있거나, 지방산과 알킬렌옥사이드의 축합 산물, 예를 들어 폴리옥시에틸렌 스테아레이트, 또는 장쇄 지방족 알코올과 에틸렌옥사이드의 축합 산물, 예를 들어 헵타데카에틸렌-옥시세탄올(oxycetanol), 또는 지방산 및 헥시톨(hexitol)로부터 유래한 부분 에스테르와 에틸렌옥사이드의 축합 산물, 예를 들어 폴리옥시에틸렌 소르비톨 모노올리에이트, 또는 지방산 및 헥시톨 무수물로부터 유래한 부분 에스테르와 에틸렌옥사이드의 축합 산물, 예를 들어 폴리에틸렌 소르비탄 모노올리에이트일 수 있다. 상기 수성 현탁액은 또한 하나 이상의 방부제, 예를 들어 에틸, n-프로필 또는 p-하이드록시벤조에이트, 하나 이상의 착색제, 하나 이상의 방향제, 및 수크로오스, 사카린 또는 아스파탐과 같은 하나 이상의 감미제를 함유할 수 있다.

[0298] 오일성 현탁액은 식물성 오일, 예를 들어 땅콩 오일, 올리브 오일, 참기름 또는 코코넛 오일, 또는 액체 파라핀과 같은 광유에서 활성 성분을 현탁함으로써 제형화될 수 있다. 상기 오일성 현탁액은 증점제, 예를 들어 밀랍, 경질 파라핀 또는 세틸 알코올을 함유할 수 있다. 상기에서 개시된 것들과 같은 감미제 및 방향제는 맛있는 경구용 제제를 제공하기 위해 첨가될 수 있다. 이들 조성물은 아스코르브산과 같은 산화 방지제의 첨가에 의해 보

존될 수 있다.

- [0299] 물의 첨가에 의해 수성 현탁액의 제조에 적합한 분산성 분말 및 과립은 분산제 또는 습윤제, 현탁제 및 하나 이상의 방부제와의 혼합물 중에 활성 성분을 제공한다. 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제는 이미 앞서 개시된 것에 의해 예시되어 있다. 부가적인 부형제, 예를 들어 감미제, 방향제 및 착색제가 또한 존재할 수 있다.
- [0300] 본 발명의 약학 조성물은 또한 수중유 유제의 형태일 수 있다. 오일상은 식물성 오일, 예를 들어 올리브 오일 또는 땅콩 오일, 또는 광유, 예를 들어 액체 파라핀, 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 유화제는 자연적으로 발생하는 포스파티드, 예를 들어 대두, 레시틴, 및 지방산 및 핵시톨 무수물로부터 유래한 에스테르 또는 부분 에스테르, 예를 들어 소르비탄 모노올리에이트, 및 에틸렌옥사이드와 상기 부분 에스테르의 축합 산물, 예를 들어 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올리에이트일 수 있다. 상기 유제는 또한 특정 감미제 및 방향제를 함유할 수 있다.
- [0301] 상기 약학 조성물은 멸균된 주사용 수성 또는 유지성 현탁액의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 상기에 언급되어 있는 이들 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 이용하여 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 상기 멸균된 주사용 제제는 또한 비독성의 비경구용으로 허용 가능한 희석제 또는 용매 중의 멸균된 주사용 용액 또는 현탁액, 예를 들어 1,3-부탄디올 중의 용액일 수 있다. 이용될 수 있는 상기에서 허용 가능한 비히클(vehicle) 및 용매로는 물, 링거액, 및 염화나트륨 등장 용액이 있다. 또한 멸균된 고정유는 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로서 사용된다. 이를 위해, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함한 임의의 비자극성 고정유가 이용될 수 있다. 또한 올레산과 같은 지방산은 주사액의 제조에서 용도를 찾는다.
- [0302] 일 실시형태에 따르면, 상기 세포는 이들의 제조를 위해 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 단리된다. 예를 들어, 상기 세포는 콜라겐 분해효소 I 및 콜라겐 분해효소 II, 썬몰리신(thermolysin) 및 비-클로스트리디아(non-clostridial) 중성 단백질 분해효소와 같은 효소, 또는 이 같은 목적으로 사용되는 기타 효소의 혼합물을 이용하여 기증자(생체 또는 시체 기증자)로부터 단리될 수 있다. 이어 상기 단리된 세포는 표준 조직 배양 플라스크 내에서 정상적인 조직 배양 조건 하에 배양될 수 있다.
- [0303] 일 실시형태에 따르면, 상기 세포, 상기 체장 선조 세포 또는 이들 두 세포는 약 0.01mg/ml 내지 약 5mg/ml; 또는 약 0.1mg/ml 내지 약 5mg/ml; 또는 약 0.5mg/ml 내지 약 5mg/ml; 또는 약 1mg/ml 내지 약 5mg/ml; 또는 약 3mg/ml 내지 약 5mg/ml; 또는 약 0.01mg/ml 내지 약 3mg/ml, 또는 약 0.1mg/ml 내지 약 3mg/ml, 또는 약 0.5mg/ml 내지 약 3mg/ml, 또는 약 1mg/ml 내지 약 3mg/ml, 또는 약 0.01mg/ml 내지 약 1mg/ml; 또는 약 0.1mg/ml 내지 약 1mg/ml; 또는 약 0.5mg/ml 내지 약 1mg/ml; 또는 약 0.01mg/ml 내지 약 0.5mg/ml; 또는 약 0.1mg/ml 내지 약 0.5mg/ml; 또는 약 0.01mg/ml 내지 약 0.1mg/ml; 또는 약 3mg/ml의 다양한 농도로 일반 화학식 I의 썬-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물, 바람직하게는 화학식 II의 화합물, 및 가장 바람직하게는 화학식 III의 화합물로 처리될 수 있다. 실시형태에 따르면, 상술한 양은 본 발명의 목적을 위한 치료학적 유효량인 것으로 고려된다.
- [0304] 다른 실시형태에 따르면, 상기 세포는 세포 생존능력 및 생존율에 대한 향상을 초래하기에 충분한 시간 동안 상기 썬-디플루오르화된 C-당펩티드 화합물과 접촉시킨다. 실시형태에 따르면, 충분한 시간은 약 12시간 내지 120시간, 또는 약 12시간 내지 약 96시간, 또는 약 12시간 내지 약 72시간, 또는 약 12시간 내지 약 48시간, 또는 약 12시간 내지 약 24시간, 또는 약 120시간, 또는 약 96시간, 또는 약 72시간, 또는 약 48시간, 또는 약 24시간, 또는 약 12시간일 수 있다.
- [0305] 다른 실시형태에서, 약학적으로 허용 가능한 담체 중에 본 발명의 방법에 따라 제조된 세포 제제가 개시되어 있다. 일 실시형태에 따르면, 상기 세포 제제는 세포 이식용 약제의 제조용으로 사용될 수 있다. 다른 실시형태에 따르면, 상기 세포 제제는 세포 이식용으로 사용될 수 있다.
- [0306] 다른 실시형태에서, 이식이 필요한 개체에 본 발명의 세포 제제를 이식하는 단계를 포함하는 이식 방법이 개시되어 있다. 상기 개체는 포유동물일 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0307] 본 발명은 본 발명의 범주를 제한하기 위한 것이 아니라 본 발명을 예시하기 위해 제공된 하기 실시예를 참고하면 더욱 용이하게 이해될 것이다.
- [0308] **실시예 1**
- [0309] **인간 베타 세포의 건강을 증강시키기 위해 AAGPTTM을 이용하기**

- [0310] **초기 특성화**
- [0311] **실험 방법**
- [0312] 하기 그룹에서 연구용 등급의 인간 섬 제제를 24시간 동안 배양한다:
- [0313] 1) AAGP™이 보충된 섬 세포; 및
- [0314] 2) 대조군(비-보충 섬 세포).
- [0315] 표준 조직 배양 플라스크를 이용하여 37℃에서 95% 공기 및 5% CO₂의 가습 분위기 하에 섬을 200IE/ml의 밀도로 배양한다. AAGP™의 농도는 3mg/ml이다. 섬 단리 후 1일째 날에 글루코오스-자극 인슐린 방출뿐만 아니라 섬 회복 및 막 보존 생존능력 염색(사이트® EB)을 포함한 몇몇 시험을 수행한다. 그 결과는 도 1A 내지 도 1D에 나타나 있다.
- [0316] **실시예 2**
- [0317] **타크로리무스 독성으로부터 인간 베타 세포를 보호하기 위해 AAGP™을 이용하기**
- [0318] **실험 방법**
- [0319] 하기 그룹에서 연구용 등급의 인간 섬 제제를 24시간 동안 배양한다:
- [0320] 1) 타크로리무스(Tac-)-무처리 베타 섬 세포;
- [0321] 2) 타크로리무스(Tac+)-처리 베타 섬 세포; 및
- [0322] 3) 타크로리무스(Tac+)-처리/AAGP™-보충 베타 섬 세포.
- [0323] 48시간 이후, 타크로리무스(10ng/ℓ)를 그룹 2 및 그룹 3에 첨가하였다.
- [0324] 표준 조직 배양 플라스크를 이용하여 37℃에서 95% 공기 및 5% CO₂의 가습 분위기 하에 섬을 200IE/ml의 밀도로 배양한다. AAGP™의 농도는 3mg/ml이다. 섬 단리 후 1일째 날에 글루코오스-자극 인슐린 방출뿐만 아니라 섬 회복 및 막 보존 생존능력 염색(사이트® EB)을 포함한 몇몇 시험을 수행한다. 그 결과는 도 2A 내지 도 2F에 나타나 있다.
- [0325] **실시예 3**
- [0326] **이식 결과를 향상시키기 위해 노화 방지용 당펩티드를 이용하기**
- [0327] **실험 방법**
- [0328] 하기 그룹에서 2개의 연구용 등급의 인간 섬 제제를 24시간 동안 배양한다:
- [0329] 1) AAGP™+-보충 섬 세포; 및
- [0330] 2) 대조군(비-보충 섬)
- [0331] 표준 조직 배양 플라스크를 이용하여 37℃에서 95% 공기 및 5% CO₂의 가습 분위기 하에 섬을 200IE/ml의 밀도로 배양한다. AAGP™의 농도는 3mg/ml이다. 24시간 후, 최소 섬 질량(약 1000IEQ)을 갖는 면역결핍 마우스(Rag1)에 대해 신장의 피막하 섬 이식(subcapsular islet transplant)을 수행하여 이식 효율을 평가하였다(n = 4 및 5, 대조군 및 AAGP™ 각각). 그 결과는 도 3A 내지 도 3G에 나타나 있다.
- [0332] **결론**
- [0333] AAGP™ 제형은 인간 섬 세포에 대해 독성을 나타내지 않는다.
- [0334] AAGP™은 배양에서 섬의 생존을 증강시키는 것처럼 보인다.
- [0335] AAGP™은 시험관 내에서 타크로리무스에 노출된 섬을 보호한다.
- [0336] 비록 AAGP™이 이식된 섬에 대한 이점을 제공하는 것처럼 보일지라도 최소 섬 질량을 이용한 이식 연구는 결론을 내지 못했다.

[0337] **실시예 4**

[0338] **섬 단리 및 정제**

[0339] 모든 실험에서 인간 섬이 사용된다. 섬은 알버타 대학교의 임상적 섬 이식 프로그램(Clinical Islet Transplant Program) 내에서 임상적 우수제조관리기준(Good Manufacturing Practice; GMP)에 따라 사망한 기증자로부터 단리된다. 간단하게는, 채장을 사망한 다기관 기증자로부터 구입하여 히스티딘-트립토판-케토글루타레이트 (HTK, 쿠스토디올(Custodiol); 캐나다 온타리오 블랜포드 소재의 메타팜(Metapharm)) 용액 또는 정적 보존 용액(PS-1; 미국 일리노이즈 이타스카(Itasca) 소재)에 보존한다. 이어 선(gland)을 리버라아제(Liberase) MTF C/T GMP(로슈 다이아노스틱스 게엠베하; 독일 맨하임 소재)로 팽창시키고, Czyme 콜라겐 분해효소 및 Czyme 썬블리신(비타사이트 엘엘피(Vitacyte LLP); 미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재)로 보충하고, 리코디(Ricordi) 챔버에서 절단하였다. 유리된 섬은 연속 밀도 구배 원심분리를 이용하여 세포 처리기(모델 2991; 미국 콜로라도주 레이크우드 소재의 코베 래버러토리스(Cobe Laboratories)) 상에서 추가로 정제한다(Islet isolation for clinical transplantation. In: Shahidul. M, (ed). The islets of Langerhans. New York: Springer, 2010).

[0340] **실시예 5**

[0341] **시험관 내 평가**

[0342] 배양 초기 및 배양 말기에 광학 계수선(optical graticule)을 이용하여 디티존(dithizone) 염색(3mg/ml 최종 농도; 캐나다 온타리오 소재의 시그마-알드리히(Sigma-Aldrich))에 의해 섬을 계수한다. 섬의 총 개수는 섬 등가량(islet equivalent, IEQ)(150 μ m의 직경으로 표준화됨)로 전환한다(Islet isolation for clinical transplantation. In: Shahidul. M, (ed). The islets of Langerhans. New York: Springer, 2010; and Ranuncoli A, et al. Cell transplantation 2000; 9(3): 409-414).

[0343] 초기 특성화를 위해, 3개의 상이한 제제로부터의 섬을 2개의 그룹으로 나누고, 10% 소 태아 혈청, L-글루타민(100mg/l), 페니실린(112kU/l), 스트렙토마이신(112mg/l) 및 HEPES(25mmol/l; NaOH에 의한 pH 7.4)가 보충된 배지(CMRL-1066; 미국 버지니아주 머내서스(Manassas) 소재의 미디어테크(Mediatech))에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂, 및 포화 습도에서 배양한다. 하나의 그룹은 AFP의 합성 유사체인 AAGPTM이 3mg/ml(프로토키네틱스(ProtoKinetix))로 보충된다. AAGPTM은 모든 배지에서 용해성이 높으며, 천연 AFP에 상응하는 높은 생리활성 특성을 보유하면서 더욱 안정한 것으로 입증되었다. 다른 그룹은 대조군으로서 작용한다.

[0344] 배양 24시간 후, 회복 생존능력 및 기능에 대해 섬을 평가하였다. 회복율은 각각의 조건에 대해 초기 계수와 비교하여 24시간 배양 이후에 생존한 섬의 비율(%)로서 계산한다. 생존능력은 대비 염색제인 사이토 그린/에티디움 브로마이드(온타리오주 벌링턴 소재의 세다레인 래버러토리스(Cedarlane Laboratories) 및 타리오주 소재의 시그마-알드리히)에 의한 형광 막 보존 검정을 이용하여 평가한다(Islet isolation for clinical transplantation. In: Shahidul. M, (ed). The islets of Langerhans. New York: Springer, 2010; Ranuncoli A, et al. Cell transplantation 2000; 9(3):409-414; Ricordi C et al. Acta diabetologica latina 1990; 27(3): 185-195; and Barnett MJ et al. Cell transplantation 2004; 13(5): 481-488).

[0345] 섬 분비 기능은 문헌[Cabrera et al Cell transplantation 2008; 16(10): 1039-1048]에 개시된 바와 같이 연속 글루코오스 자극 도중에 시험관 내 인슐린 분비 프로파일을 모니터링함으로써 평가한다. 이러한 시험관 내 주변관류 검정은 생리적인 섬 반응을 모델링하기 위해 교번적인 정상 혈당 환경 및 고혈당 환경에서 섬에 스트레스를 가하기 위한 연속 글루코오스-자극 인슐린 분비(GSIS) 시험 양식이다. 주변관류 검정으로부터의 상청액을 수집하고, 상업적으로 이용 가능한 ELISA 키트(인슐린 ELISA 키트; 미국 펜실베이니아주 피츠버그 소재의 메르코디아(Mercodia Inc.))를 이용하여 인슐린 수준을 결정한다. 결과는 100IEQ에 대해 정규화된 낮은 글루코오스 자극 기준선(2.8mMol)과 비교하여 인슐린 분비의 배수 변화로서 표시된다.

[0346] **실시예 6**

[0347] **타크로리무스 독성**

[0348] 타크로리무스-유도 독성에 대한 AAGPTM의 세포 보호 능력을 평가한다(Johnson JD et al, Cell transplantation 2009; 18(8): 833-845). 6개의 상이한 연구용 등급의 인간 제제로부터의 섬을 3개의 그룹으로 분리한다: 1개의 AAGPTM-보충 그룹 및 2개의 비-보충 대조군. 유사한 배양 조건에서 섬을 24시간 동안 방치한 후, AAGPTM 그룹 및 대조군 그룹 중 하나(양성 대조군)에 타크로리무스(PrografTM, 캐나다 온타리오 마크햄(Markham) 소재의 아스텔라스 파마 캐나다(Astellas Pharma Canada Inc.))를 첨가한다. 타크로리무스를 임상적으로 적절한 투여량인

10ng/ml의 농도로 배양 배지에 첨가하고, 모든 그룹을 추가적으로 24시간 동안 배양한 후, 주변 재관류를 실시하고 전염증성 사이토카인, 산화적 스트레스 및 세포사멸을 결정한다. 그 결과는 도 ??에 나타나 있다.

[0349] **실시예 7**

[0350] **전염증성 사이토카인 및 케모카인**

[0351] 타크로리무스에 대한 24시간의 노출 이후, 모든 그룹의 배양 배지로부터의 샘플을 냉동시키고, 멀티-스팟 인간 전염증성 7-플렉스 울트라-센서티브(Multi-Spot Human ProInflammatory 7-Plex Ultra-Sensitive) 키트(미국 메릴랜드 주의 게이터스버그 소재의 메소스케일 디스커버리[®](Meso Scale Discovery[®]))를 이용하여 관련된 사이토카인 및 케모카인(IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, 각질 형성 세포-유래 케모카인(KC) 및 TNF- α)을 측정하고, 섹터[™] 영상장치(SECTOR[™] Imager; 미국 메릴랜드 주의 게이터스버그 소재의 메소스케일 디스커버리[®]) 상에서 분석한다. 결과는 절대 값(pg/ml)으로서 표시하고, CMRL 배양 배지 단독은 비교용 대조군으로서 사용된다.

[0352] **실시예 8**

[0353] **ROS 분석**

[0354] 모든 그룹으로부터의 냉동 샘플은 아크리단 루미젠[™] PS-3 검정(아머샴 ECL 플러스(Amersham ECL Plus) 키트; 캐나다 온타리오 오타와 소재의 피셔 사이언티픽스(Fisher Scientific Inc.))를 이용하여 배양 배지에서 활성 산소종(ROS)을 결정하기 위해 이용된다(18). 이러한 검정에서, 아크리단 루미젠[™] PS-3은 과산화수소의 존재 하에 활성 산소 및 질소종(RNS)에 의해 여기되어, 430nm에서 화학 발광을 발생한다. 배지 샘플은 액체 질소로 급속 냉동하고, 상기 검정을 수행하기 전까지 저장한다. CMRL 배양 배지 단독은 대조군으로서 사용되고, 결과는 대조군 배지와 비교하여 배수 변화의 증가로서 표현된다.

[0355] **실시예 9**

[0356] **세포사멸 분석**

[0357] 개열된 카스파아제-3 분광 광도 검정 및 말단 테옥시뉴클레오타이드 전이효소 dUTP Nick-엔드 라벨링(TUNEL) 염색을 이용하여 모든 그룹에서 세포사멸을 측정한다. 100IEQ의 정규화된 그룹 및 이들의 상응하는 배양 배지에 대한 모든 실험이 이루어진다.

[0358] 냉동된 배지 샘플은 분광 광도 검정(EMD 밀리포어[™](EMD Millipore[™]); 미국 매사추세츠주 빌레리카 소재)을 이용하여 개열된 카스파아제-3의 증가를 결정하기 위해 사용된다. 다시, 첨가제를 함유하지만 세포는 없는 CMRL 배양 배지 단독은 대조군으로서 사용되며, 결과는 대조군 배지와 비교하여 배수 변화의 증가로서 표현된다.

[0359] TUNEL 염색(데드엔드[™](DeadEnd[™]) 세포사멸 검출 시스템; 위스콘신주 매디슨 소재의 프로메가(Promega))을 위해, 섬을 포르말린에 고정하여 가공하고, 파라핀에 포매한다. 필드에 존재하는 이식편(인슐린), 세포사멸 세포 및 모든 핵을 확인하기 위해 동시 염색(co-staining)을 수행한다. 세포사멸은 이미지제이(ImageJ) 소프트웨어를 이용하여 양성의 TUNEL 염색 영역의 비율(%)로 정량화한다.

[0360] **실시예 10**

[0361] **이식**

[0362] 8 내지 12주령 면역결핍 마우스(B6.129S7-Rag1^{tm1Mom})는 잭슨 래버러토리(Jackson Laboratory; 미국 마이애미주 바 하버(Bar Harbor) 소재)로부터 수득하고, 임의로 음식 및 물에 대한 접근과 함께 특정 무-병원균 조건 하에 사육한다. 캐나다 동물 실험 윤리 위원회(Canadian Council on Animal Care)의 지침서에 따라 동물을 관리하고, 앨버타 대학교의 동물 복지 위원회(animal welfare committee)로부터 윤리적 승인을 얻었다.

[0363] 스트렙토조토신(streptozotocin(STZ); 캐나다 온타리오 소재의 시그마-알드리히)을 180mg/kg의 투여량으로 복강 내 주사함으로써 당뇨병을 화학적으로 유도한다. 2회 연속 혈당 측정치가 18mmol/l 이상인 것으로 기록한 이후에 동물을 당뇨병에 걸린 것으로 간주한다.

[0364] 그룹 당 10마리의 동물은 앞서 개시된 좌측 신장의 캡슐 하에 이식된 약 1,000IEQ의 인간 섬을 투여 받았다(19).

[0365] **실시예 11**

[0366] **24시간 시점에 이식 신장 절제술**

[0367] 그룹 당 3마리의 마우스가 신장 절제술을 받았고, 이식편 영역에서 전염증성 사이토카인, 개열된 카스파아제-3 및 TUNEL의 급성 결정을 수행하기 위해 이식 24시간 후에 안락사 시켰다. 모든 경우에, 섬 이식편은 신장으로 부터 절제되고, 무게를 측정하고, 액체 질소에서 급속 냉동하며, -80°C 에서 저장한다. 후속적으로 조직 200mg 당 1ml의 용해 완충액(0.15M NaCl, 1mM 트리스-HCl, 0.1% SDS, 0.1% 트리톤 X-100, 20mM 테옥시콜산나트륨 및 5mM EDTA)을 이용하여 조직 샘플을 용해한다. 이어 용해물을 얼음 상에서 30초 동안 2회 반복하여 균질화하고(파워진(PowerGen); 캐나다 온타리오 소재의 피셔 사이언티픽스), 얼음 상에 있는 동안에 10회의 속맥으로 초음파 처리한다(비르소닉(VirSonic); 미국 뉴욕주 소재의 비르티스(VirTis)). 세포 잔해는 4°C 에서 10분 동안 14,000rpm으로 원심분리 하여 펠릿화하고, 얻어진 상청액을 수집하고, 용해물 1ml 당 $10\mu\text{l}$ 의 단백질 분해효소 억제제 카테일(캐나다 온타리오 오크빌 소재의 시그마-알드리히 캐나다)(1:100)을 함유하는 마이크로원심분리관에 넣는다.

[0368] 이식편 샘플은 앞서 개시된 바와 같이 전염증성 사이토카인/케모카인, 카스파아제-3 및 TUNEL 염색에 대해 검정한다(상응하는 마우스 키트를 이용함). 모든 결정은 조직 1g에 대해 조절한다.

[0369] **실시예 12**

[0370] **장기적 이식편 기능**

[0371] 휴대용 혈당측정기(원터치 울트라2(OneTouch Ultra 2); 캐나다 소재의 라이프스캔(LifeScan))를 이용하여 60일에 걸쳐 1주 당 3회씩 그룹 당 나머지 7마리의 마우스에서 비-공복시 혈당을 모니터링한다. 2회 연속 판독이 11.3mmol/l 미만인 경우에 정상 혈당으로 규정한다.

[0372] 복강 내 글루코오스-내성 시험(IPGTT)은 하룻밤 동안 단식 이후에 글루코오스 볼루스(3g/kg)에 반응하는 섬의 능력을 평가하기 위해 이식 60일 후에 수행한다. 혈당 수준은 기준선(주사 후 시간: 0분, 15분, 30분, 60분, 90분 및 120분)에서 모니터링한다. 모든 결과는 순전한 대조군 마우스의 혈당 프로파일과 비교한다.

[0373] 회복 신장 절제술은 이식편 의존형 정상 혈당을 증명하기 위해 모든 동물에 대해 65일째 날에 수행한다. 비-공복시 혈당 수준은 신장 절제술 이후 1주 동안 기록한다. 유사하게, 순전한 췌장은 말단 종점에서 절제하고, 10% 포르말린에 고정하며, 면역 조직 화학에 의해 분석하여 마우스 인슐린 염색이 존재하지 않음을 확인하며, 그 결과 잔류하는 췌장 베타 세포를 제거하고 순전한 췌장 베타 세포의 기능의 재생을 제거한다.

[0374] 이어 보존된 이식편을 앞서 개시된 바와 같이 가공하고, 생존한 섬의 척도로서 인간 인슐린 ELISA를 이용하여 잔류 인슐린 함량을 결정한다.

[0375] **실시예 13**

[0376] **통계적 분석**

[0377] 데이터는 평균 \pm 평균의 표준 오차(SEM)로서 나타낸다. 곡선 하의 면적은 GSIS 및 IPGTT에 대해 계산하고, 그룹 간 차이는 일원 분산 분석(one-way ANOVA) 및 터키즈 포스트 후 시험(Tukey's post hoc test)에 의해 분석한다. p -값(< 0.05)은 유의한 것으로 고려되며, 모든 분석은 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)(그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software); 미국 캘리포니아주 라호이아(La Jolla) 소재)을 이용하여 수행한다.

[0378] **실시예 14**

[0379] **AAGP™은 배양에서 섬의 보존을 증강시킨다**

[0380] 섬 질량 보존 및 기능 변화를 평가하기 위해 3개의 상이한 제제로부터의 단리된 인간 섬을 AAGP™가 보충되거나 보충되지 않은 배지에서 24시간 동안 배양한다. 배양 24시간 이후에 섬을 계수하였으며, 그 결과 섬 회복에서 유의한 차이를 초래한다. 비록 막 보존 검정(데이터 미도시)에 따른 세포 생존능력에서의 차이가 없었지라도 더욱 많은 수의 생존한 섬이 AAGP™이 보충된 그룹에서 관측된다($76.62 \pm 7.4\%$ 대비 $50.63 \pm 6.2\%$; $p = 0.029$)(도 4A).

[0381] 이들 2개 그룹의 시험관 내 기능(GSIS)을 비교하면, 주변관류 곡선($p < 0.001$)에서 나타난 바와 같이 AAGP™이 보충된 섬으로부터의 인슐린 분비의 유의한 증가가 제 2 분비기 도중에 관측된다(도 4B). 얻어진 곡선 하의 면적에 따르면, AAGP™이 보충된 섬으로부터 인슐린 방출이 전체적으로 증가하는 것으로 확인되었다($\text{AUC}, 149.5 \pm 0.5$ 대비 75.5 ± 0.5 , $p < 0.001$)(도 4C).

[0382] **실시예 15**

[0383] **AAGP™는 타크로리무스 관련 손상에 대해 섬을 효과적으로 보호한다**

[0384] 칼시뉴린 억제제(CNI) 및 특히 타크로리무스의 공지된 당노 유발성 효과에 기초하여 독성 섬 검정을 수행하고, AAGP™의 세포 보호 능력을 평가한다. 또한, 6개의 상이한 제제로부터의 단리된 인간 섬은 AAGP™가 보충되거나 보충되지 않는 배지에서 24시간 동안 배양한 후, 10ng/ml의 임상적으로 적절한 투여량으로 타크로리무스에 24시간 동안 노출시킨다. AAGP™의 세포 보호 효과를 검토하기 위해, 배양 배지 단독(Tac-), 타크로리무스 단독(Tac+) 또는 타크로리무스가 보충된 AAGP™(Tac+AAGP™)의 존재 하에 섬을 배양한다. 정해진 배양 기간 이후에 모든 그룹은 시험관 내 생존, 생존능력, 기능 및 산화적 스트레스에 대해 특성화한다.

[0385] AAGP™에 의한 보충은 공지된 β -세포 독성 물질인 타크로리무스의 존재 하에도 불구하고 배양 이후에 섬 생존의 증가를 초래하였다. 상기 Tac+AAGP™ 그룹은 타크로리무스에 결코 노출되지 않는 섬에 대해 유사한 회복율을 나타냈다. 그러나 생존은 Tac+ 그룹과 비교했을 때 유의하게 증가한다(67.65% 대비 31.55%, $p < 0.001$)(도 5A). 막 보존 염색(데이터 미도시)에 의한 세포 생존능력에서의 차이는 없지만, GSIS 주변관류에 따르면 Tac+와 Tac+AAGP™ 사이 인슐린 분비의 명확한 차이가 야기된다. AAGP™이 보충된 그룹은 타크로리무스에 결코 노출되지 않은 대조군 섬과 유사한 글루코오스에 대한 2상 인슐린 반응을 나타냈다. 반대로, Tac+ 그룹은 매우 손상된 반응을 야기하였다(AUC: Tac- 대비 Tac+: 158.8 대비 8.22, $p < 0.001$; Tac- 대비 Tac+AAGP™: 158.8 대비 129.3, $p = 0.231$; Tac+ 대비 Tac+AAGP™: 8.22 대비 129.3, $p = 0.003$)(도 5B 및 도 5C).

[0386] 배양 및 타크로리무스에 대한 노출 도중에 인간 섬에서 발생하는 산화적 스트레스에 대한 AAGP™의 가능한 영향은 세포 외 ROS에서의 배수 증가에 의해 측정된다. 배지 샘플은 타크로리무스 노출 24시간 이후에 각 그룹으로부터 채취하고, 아크리단 루미노젠 PS-3 검정에 의해 분석한다. 예상된 바와 같이, 모든 샘플에서 산화적 스트레스가 발생하였지만, 타크로리무스에 대한 노출에 의해 ROS에서의 상당한 증가가 초래하였다(도 6A). 그러나 이러한 현상은 AAGP™의 존재 하에 개선된다($p = 0.012$).

[0387] 6개의 상이한 제제로부터의 단리된 인간 섬은 AAGP™가 보충되거나 보충되지 않는 배지에서 24시간 동안 배양하고, 추가의 24시간 동안 타크로리무스를 보충하였다. 총 48시간의 배양 기간 이후, 모든 그룹은 시험관 내 생존, 생존능력, 기능 및 산화적 스트레스에 대해 특성화 하였다.

[0388] 예상된 바와 같이, 모든 샘플에서 산화적 스트레스가 발생하였지만, 타크로리무스에 대한 노출에 의해 ROS에서의 상당한 증가가 초래하였다(도 6A). 그러나 이러한 현상은 AAGP™의 존재 하에 개선된다($n = 3$, $p < 0.05$).

[0389] 유사한 실험 조건을 재현하고(AAGP™의 유무 하에 배양하고 타크로리무스에 노출된 인간 섬), s-GSIS 검정을 수행하고 동시 발생의 세포 내 인슐린 함량을 측정하기 위해 각각 상응하는 그룹에 대해 3일째 날에 약 100IEQ의 분액을 수집하였다. 이어 타크로리무스를 제거하기 위해 섬을 광범위하게 세척하고, 4일 이상 동안 방치하였으며, 이때 샘플링 및 비교 시험을 7일째 날에 반복하였다.

[0390] 초기 평가에서와 같이, Tac+ 그룹은 3일째 날에 인슐린 분비가 유의하게 손상된 것으로 나타났으며, Tac+AAGP™ 시리즈에서 관측되지 않았다(자극 지수 1.4 대비 9.7, $p < 0.01$, 도 6B). 그러나 인슐린 분비에서 이러한 감소는 일시적이며, 타크로리무스가 더 이상 존재하지 않는 7일째 날 정도에 그룹 간 차이는 사라졌으며, 그 결과 배양 기간 말기에 예상된 전체적인 섬 효능의 감소에 대해 조정하였다. 인슐린 분비 프로파일에서의 차이에도 불구하고, 세포 내 인슐린 함량은 그룹 전반에 걸쳐 안정하고 필적할 정도로 유지되었으며, 이는 베타 세포에서 인슐린의 생합성에 대해 어떠한 변화도 없다는 것을 나타낸다(도 6C 및 도 6D).

[0391] **실시예 16**

[0392] **AAGP™은 타크로리무스의 면역억제제 능력을 억제하지 않는다**

[0393] AAGP™가 타크로리무스에 의한 T 세포 증식의 억제를 억제하지 않는다는 것을 확인하기 위해, 마우스 비장세포를 이용한 혼합 림프구 반응을 수행하였다. 상기 검정에서는 CFSE 염색 수준에 의한 T 세포 증식 반응이 측정된다. 예상된 바와 같이, T 세포 증식은 IgG 대조군에 비해 타크로리무스의 존재 하에 유의학 감소하였다($n = 4$, $p < 0.001$). 또한 CD8+ 및 CD4+ 양성 T 세포의 증식은 타크로리무스 단독 존재 하에 또는 AAGP™와의 조합에서 유의하게 감소하였다(두 경우 모두에서 $n = 4$, $p < 0.001$). 그러나 AAGP™ 단독에 대한 노출이 있는 경우에 T 세포의 증식에서 유의한 감소는 없었다(도 7).

[0394] **실시예 17**

[0395] **섬의 세포 내 칼슘 함량 및 외포작용에 대한 타크로리무스 효과**

[0396] CNI-관련 손상 및 이의 회피를 특성화함으로써 AAGP™에 대한 잠재적인 작용 기작을 규명하기 위해 인간 섬에 대해 다양한 전기 생리학(electrophysiology) 연구를 수행하였다. 그룹 간에는 칼슘 유입에서의 유의한 차이는 발견되지 않았으며(도 8A 및 도 8C), 이는 가능한 작용 기작이 인슐린 경로에서 더욱 하류에 있다는 것을 나타낸다.

[0397] 상보적인 정전용량 연구는 높은 글루코오스 자극 시에 외포작용의 직접적인 지표로서 이들 동일한 조건으로 수행하였다. 상기 결과에 따르면, 기타 그룹과 비교하여 Tac+ 그룹에 대한 누적 정전용량이 감소하는 것으로 나타났다, Tac+AAGP™ 그룹과 비교할 때 곡선 하의 면적이 유의하게 낮은 것으로 나타났다(AUC: 39.08 대비 68.01, $p < 0.01$)(도 8B 및 도 8D).

[0398] **실시예 18**

[0399] **AAGP™는 이식 직후에 염증 반응을 개선한다**

[0400] 본 발명자의 시험관 내 발견을 보완하기 위해 추가적인 생체 내 시험을 수행한다. 동일한 연구 그룹(Tac-, Tac+ 및 Tac+AAGP™)을 이용하여 화학적으로 유도된 면역결핍 당뇨병 마우스(그룹 당 $n = 10$)에서 최소 질량(약 1,000IEQ)의 섬 이식을 수행한다. 이식 후 국부적인 염증 반응에 대한 AAGP™의 가능한 효과를 측정하기 위해, 각 그룹에서 3마리의 동물로부터 회복된 이식편(이식 후 24시간)을 균질화하고, 전염증성 사이토카인 및 케모카인에 대해 특성화 한다.

[0401] IL-1 β 의 급성 수준은 순전한 마우스에서의 수준에 비해 모든 그룹에서 증가한다. Tac+ 그룹에서의 수준은 유의하게 더 높지만, AAGP™의 첨가는 이러한 사이토카인 분비를 상당히 약화시킨다(17.81 대비 4.94pg/ml/g-조직, $p < 0.001$)(도 9A). IL-6 수준을 측정한 경우에도 유사한 효과가 관측되며, 그 결과 AAGP™가 존재하는 경우에 유의한 감소를 초래하였다(147.8 대비 54.4pg/ml/g-조직, $p < 0.001$)(도 9B). 그러나 타크로리무스가 노출된 그룹 사이에는 TNF- α 수준에서 인식 가능한 차이는 없다(1.63 대비 1.34pg/ml/g-조직)(도 9C).

[0402] 이식 후 급성으로 측정된 케모카인 중에서, 호중구 모집과 관련이 있는 KC 분비는 주요 분비 변화와 연관되어 있다. IL-1 β 및 IL-6에서와 같이, KC는 Tac+ 그룹에서 유의하게 과발현되고, 또 다시 AAGP™의 존재 하에 유의하게 감소한다(9.79 대비 3.58pg/ml/g-조직, $p < 0.001$)(도 9D). 시험관 내 사이토카인 및 케모카인의 발현을 비교한 경우(데이터 미도시) 그룹 간의 유의한 차이는 관측되지 않는다.

[0403] **실시예 19**

[0404] **AAGP™은 이식 후 섬 세포사멸을 감소시킨다**

[0405] 급성으로 제거된 이식편(이식 24시간 후)을 또한 이식편 내 세포사멸에 대해 분석한다. 개열된 카스파아제-3의 수준에서 배수 변화의 증가는 순전한 마우스의 신장에서의 기저 수준에 대해 결정된다. Tac+AAGP™에 대해 Tac+ 그룹에서 카스파아제-3의 수준에서 유의한 증가가 있으며, 이는 본질적으로 타크로리무스에 결코 노출되지 않는 섬의 수준과 매우 유사한 것으로 나타났다(3.14 대비 1.46, $p < 0.001$)(도 10B). 나머지 이식편 섹션은 TUNEL 검정을 이용하여 세포사멸에 대해 추가로 분석하였으며, 이는 Tac+AAGP™ 및 대조군과 비교할 때 Tac+ 그룹에서 TUNEL 양성 세포의 우세한 비율(%)과 일치된 결과를 나타낸다(53.3% 대비 24.0% 대비 14.9%, $p < 0.023$)(도 10A 및 도 10C).

[0406] **실시예 20**

[0407] **타크로리무스 노출에도 불구하고 AAGP™ 보충에 의한 향상된 생체 내 섬 기능**

[0408] 나머지 이식된 마우스(그룹 당 $n = 7$)는 이식 효율을 결정하고 장기적 이식편 기능을 평가하기 위해 이식 후 60일까지 추적 조사한다. 정상 혈당의 비율을 결정하기 위해 주기적으로 혈당을 모니터링한다. 이러한 주변 섬 질량 모델에서 예상된 바와 같이, 생착 지연이 관측된다. 60일째 끝나는 날까지 모든 마우스가 고혈당으로 유지된 Tac+ 그룹과는 대조적으로 Tac- 그룹 및 Tac+AAGP™ 그룹에서는 시간이 지남에 따라 혈당이 향상되었다(도 11A).

[0409] 이식 60일 후 연구 그룹은 섬 이식 기능을 평가하기 위해 IPGTT를 받았다. 상기 Tac- 그룹 및 Tac+AAGP™ 그룹 둘 모두는 적절하게 반응하였지만, Tac+ 그룹은 120분 정도에 당뇨가 심각하게 유지되었다(AUC: Tac- 대비 Tac+AAGP™: 92.63 대비 91.20, $p = 0.095$; Tac- 대비 순전한 그룹: 92.63 대비 71.43, $p = 0.434$; Tac+AAGP™ 대비 순전한 그룹: 91.20 대비 71.43, $p = 0.423$; 및 Tac+ 대비 Tac+AAGP™: 149.8 대비 91.2, $p = 0.021$)(도 11B).

11B).

- [0410] 이식된 섬이 상기 관측된 정상 혈당에 전적으로 책임이 있다는 것을 증명하기 위해, 60일째 날에 이식편 회복 신장 절제술을 수행한다. 모든 마우스는 이들의 이전 당뇨병 상태로 복귀하였으며, 이는 이들의 고유 췌장의 약한 인슐린 염색에 의해 확인되었다(데이터 미도시).
- [0411] 이식편 회복 시, 인슐린 함량은 이식 60일 후에 잔류 섬 질량의 지표로서 결정된다. 도 11C는 타크로리무스에 노출된 이식편에서 인슐린 함량의 상당한 감소와 함께 그룹 간 명확한 차이를 나타낸다. 또한 AAGP™의 존재는 타크로리무스에 대한 노출에도 불구하고 섬 보호에는 유익하다(Tac+ 대비 Tac+AAGP™: 30.86 대비 100.8ng/ml, $p < 0.01$).
- [0412] 이들 발견을 추가로 지지하기 위해, 임상 실습과 유사하도록 타크로리무스에 의한 연속 치료를 이용한 공통 유전자 당뇨병 마우스 이식 모델에서 이식 실험을 수행하였다. 시험관 내 설정 환경에서와 같이, 타크로리무스(쥐의 타크로리무스 대사에서의 차이를 설명하기 위한 이러한 경우에 더욱 높은 농도)에 노출된 이식된 섬은 인슐린을 효과적으로 분비할 수 없었으며, 동물은 정상 혈당 상태로 복귀하였다. 그러나 AAGP™의 존재로 인해 섬은 정상적으로 기능을 하게 되었고, 정상 혈당이 달성된 기간은 대조군 그룹과 유사하였다(도 11D 및 도 11E, $p < 0.001$).
- [0413] 이들 발견은 또한 타크로리무스 처리 하에 초기 복강 내 글루코오스 내성 시험(IPGTT)을 비교할 때 관측되었으며, 기타 그룹과 비교할 때 Tac+ 그룹에서의 조절이 명백히 효과적이지 않았다(도 11F, AUC: 101 대비 54.69 및 59.26, $p < 0.01$).
- [0414] 일단 타크로리무스 처리가 중단되면, 섬은 이들의 정상적인 기능을 회복하였으며, 동물은 이들의 대응 연구와 같이 정상 혈당으로 되었다. 종점(30일)에서의 반복 IPGTT에서, 높은 글루코오스 볼루스에 의해 도전을 받게 되는 경우에 차이는 사라지고 모든 동물을 유사하게 행동한다(도 11G).
- [0415] **토의**
- [0416] 본원에서 증명된 것은 섬 배양 배지에 강력한 AFP인 AAGP™의 첨가는 인간 섬 생존 및 시험관 내 기능의 상당한 보호를 제공한다는 것이다. 또한 AAGP™은 타크로리무스-관련 손상으로부터 인간 섬을 보호하였으며, 생착을 포함한 생체 내 이점을 가지며, 이는 급성 염증, 세포사멸 및 장기적 이식편 기능의 마커(marker)였다.
- [0417] 섬 배양이 임상적 이식에서 상당한 유연성을 제공할지라도, 기증자로부터의 다중 인자 및 단리 공정으로 인해 14 내지 20%의 섬 손실이 일상적으로 관측된다(Kin T et al. Transplant international: official journal of the European Society for Organ Transplantation 2008; 21(11): 1029-1035). 상기 배양 배지에 AAGP™가 보충되는 경우, 섬 회복 및 기능에서의 유의한 향상이 상이한 인간 섬 제제에서 일관되게 관측된다.
- [0418] AFP가 저체온증 하에 세포를 보호하는 기작은 여전히 명확하지 않다. 다양한 저자들은 저온에서 발생하는 통제할 수 없는 이온 전달을 차단하는 이들 분자의 막 안정화 역할을 보고하며, 이러한 이온 전달은 세포 파괴에 대한 위험성을 낮춘다(22). 이러한 기작은 심지어 정상 온도 조건에서도 저산소증 및 국소빈혈-재관류의 결과로서 발생할 수 있는 불규칙한 막 투과성을 고려하면 본 발명자의 실험 설계에 충분히 적용할 수 있다(Karle C et al. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 2004; 286(6): L1154-1160; Weir EK et al. Cardiovascular research 2006; 71(4): 630-641; Belliard A et al. American journal of physiology Heart and circulatory physiology 2013; 304(1): H94-103.).
- [0419] 타크로리무스는 섬 이식 분야에서 광범위하게 사용되는 면역억제제이며, 급성 및 만성 거부반응 및 재발성 자가면역의 위험성을 낮추기 위해 일상적으로 사용되는 주요 요소이다(Shapiro AM et al. The New England journal of medicine 2000; 343(4): 230-238.). 그러나 이러한 CNI 및 기타 CNI의 장기간 사용은 부작용, 주로 신독성(nephrotoxicity) 및 이식 후 당뇨병과 연관이 있었다(Chand DH et al. Pediatric transplantation 2001; 5(1): 32-36). 사실상, 타크로리무스 및 사이클로스포린 둘 모두 관련된 손상은 섬에서 보고되어 왔으며, 이는 칼시뉴린/활성화 T-세포의 핵인자(NFAT) 시그널링의 억제(Oetjen E, et al. Molecular pharmacology 2003; 63(6): 1289-1295), 인슐린 유전자 억제(Hernandez-Fisac I et al. American journal of transplantation 2007; 7(11): 2455-2462), 미토콘드리아 정지(arrest)(Rostambeigi N et al. Transplantation 2011; 91(6): 615-623) 및 이식 후 혈관형성의 감소(Nishimura R et al. PloS one 2013; 8(4): e56799)를 포함한 몇몇 기작에 의해 특성화되어 있다.
- [0420] 본원에서 나타난 바와 같이, 임상적으로 적절한 투여량의 타크로리무스의 시험관 내 존재는 배양에서 생존을 감

소시키고 인슐린 분비를 억제함으로써 인간 섬에 대해 매우 유해한 반면, AAGP™의 첨가에 의해 이러한 독성에 대해 인간 섬이 명백히 보호받았다.

[0421] 섬은 배양을 통한 기증 및 내분 이식으로부터 나타나는 저산소증에 매우 민감하다. 이러한 현상은 이들의 높은 산소 요구 및 크기에 주로 기인하며, 배양 도중에 접촉 밀도에 따라 해로운 pO_2 구배를 야기하는데 책임이 있다 (Papadimitrakaki et al. Transplantation proceedings 2005; 37(8): 3412-3414). 산화 방지 능력의 감소로 인해 섬은 산화적 스트레스에 취약하다(Sklavos MM et al. Diabetes 2010; 59(7): 1731-1738). 이들 요소는 배양 도중 및 이식 이후에 섬 손실에 기여한다. 상기 발견에 따르면, 배양 배지에서 세포 외 ROS의 증가에 의해 증명된 바와 같이 Tac+ 그룹에서 산화적 스트레스가 증가하는 것으로 나타난다.

[0422] 모든 시험관 내 발견을 보완하고 AAGP™의 보충을 초기 염증, 세포 사멸, 생착 및 장기적 효능과 연관시키기 위해 생체 내 실험을 수행한다. 급성 안락사된 마우스의 이식편 특성화는 연구 화합물의 소염 능력의 명백한 증거를 나타낸다. AAGP™-보충 섬은 배양에서 타크로리무스에 대한 노출에도 불구하고 각질 형성 세포 케모카인의 분비 감소와 함께 IL-1 β 및 IL-6의 발현의 유의한 감소를 나타냈다. TNF- α 와 더불어 이들 사이토카인 및 케모카인은 이식 후 염증 반응 및 후속적인 적응성 면역 활성화에서 주요 참여 인자이다(Kanak MA et al. International Journal of Endocrinology 2014).

[0423] 타크로리무스는 또한 섬에서 세포 사멸의 증가와 연관이 있었다(Johnson JD et al. Cell transplantation 2009; 18(8): 833-845). 본 실험에서는 세포사멸의 지표로서 이식편에서의 개열된 카스파아제-3의 배수 변화를 측정 한 후, 동일한 이식편에 대해 TUNEL 염색을 수행하였다. 결과에 따르면, 타크로리무스에 결코 노출되지 않은 순전한 인간 섬에 대해 유사한 수준으로 AAGP™-보충 그룹에서 세포사멸이 일관적으로 감소하는 것으로 나타났다.

[0424] 연구가 끝날 무렵에 수행된 글루코오스 내성 시험에 따르면, 또한 순전한 마우스와는 유의하게 상이하지는 않는 Tac- 그룹 및 Tac+AAGP™ 그룹에 대해 유사한 글루코오스 정규화 비율을 나타냈다. 이들 결과는 최종 인슐린 함량으로서 표시된 잔류 이식편 질량과 상관관계가 있었다. 한편, AAGP™ 부재 하의 타크로리무스 노출의 유해 효과는 생착기(engraftment phase) 도중에 섬을 손상시키기에 충분한 것처럼 보였으며, 이는 글루코오스 불루스에 의한 도전 이후에 혈당 감소도 나타나지 않았으며, 글루코오스 정규화의 실패도 없었다.

[0425] 본 발명자의 실험을 임상적으로 더욱 적절하게 하기 위해, 피하 삼투 펌프에 의한 연속적인 처리로서 타크로리무스를 이용하는 새로운 생체 내 공통 유전자 마우스 이식 모델을 수행하였다. 이식된 섬의 기능 장애가 CNI의 투여를 시작한 직후에 발생하였으며, 전체 처리 기간(7일) 동안 지속되는 것으로 관측되었다. 일단 면역 억제가 중단되면, 이식편 기능은 점진적으로 정규화되었으며, 중점 정도에 모든 그룹은 상당한 수준이었다.

[0426] 그러나 AAGP™로 처리된 섬은 높은 투여량의 CNI의 존재에 의해 영향을 받은 것처럼 보이지 않았으며, 대조군과 유사하게도 완전하게 기능을 하였다.

[0427] 이들 발견은 약물이 제거된 경우에 반전될 수 있는 타크로리무스의 일시적인 유해 효과를 나타내는 이전의 시험관 내 실험을 지지한다. 자명하게도, 타크로리무스의 중단은 현재로서는 임상 현장에서의 가능성이 아닐 수 있다. 아마도, 비록 AAGP™ 분자를 환자에게 투여하기 전에 추가적인 조절 독성 연구가 요구될지라도 세포 보호 효과를 연장시키기 위해 동시에 AAGP™로 이들 개인을 처리하는 것이 해결책일 수 있다.

[0428] 섬에 대한 AAGP™의 이로운 효과의 엄청난 증거가 수집되었음에도 불구하고, 이러한 약물에 대한 명백한 작용 기작, 또는 타크로리무스 독성을 회피하기 위한 기계론적 공정은 공지된 바가 없다. 이들 실험 도중에 타크로리무스의 항-증식 효과에서 AAGP™의 간섭 없이 MLR 검정을 수행함으로써 AAGP™가 존재하는 경우에 타크로리무스의 직접적인 약리학적 억제는 없는 것으로 증명되었다.

[0429] 게다가, 타크로리무스와 AAGP™은 모두 섬에서 칼슘 농도에 영향을 미치지 않는 것으로 또한 밝혀졌으며, 이러한 칼슘 농도는 베타 세포에서 인슐린 합성/분비 기작에서 주요한 요소이다. 이러한 정보는 분비 경로에서 더욱 하류에 있는 잠재적인 타크로리무스의 기계론적 부위를 암시하는 최근에 공개된 증거를 지지한다(Uchizono Y, et al. Endocrinology 2004; 145: 2264-2272). 사실상, 섬에 대한 정전용량의 측정에 따르면, Tac+ 그룹과 Tac+AAGP™ 그룹 사이에는 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 이들 발견은 Tac+AAGP™에서는 관측되지 않은 손상된 외포작용의 지표로서 해석될 수 있다.

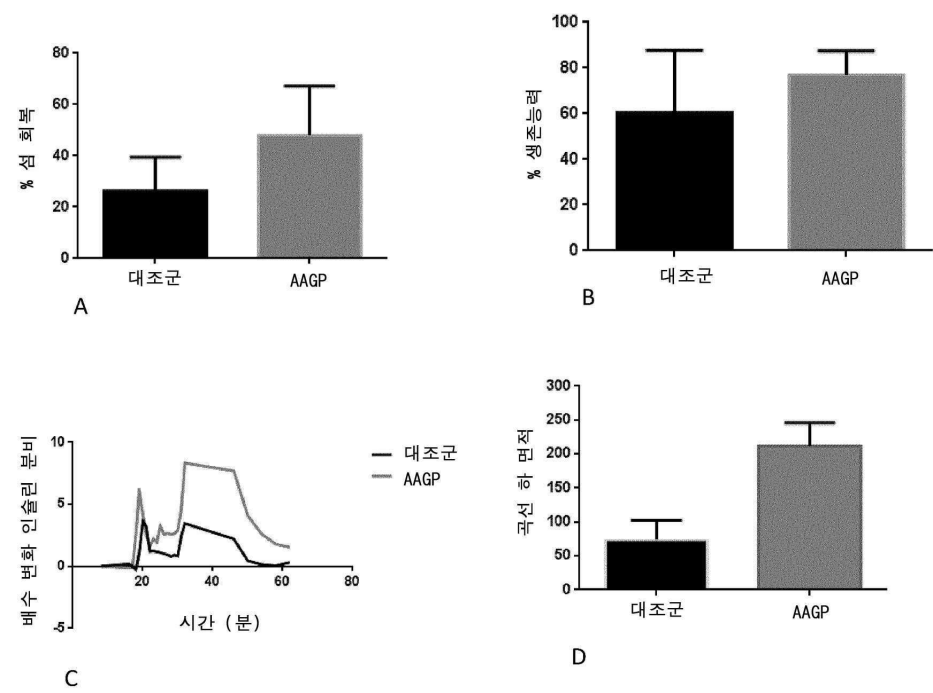
[0430] 결론적으로, 배양 도중에 인간 섬에 AAGP™를 보충하면 섬-독성 물질인 타크로리무스의 존재 하에서도 최종 제제의 품질 및 수율이 향상되며, 생착 향상으로 이어졌다. 이러한 접근법은 잠재적으로는 단일 기증자 섬 이식에

대한 잠재적인 전략으로서 임상적 이식에 대한 개선을 가져올 수 있다. 이는 또한 세포, 조직 및 기관의 보존에서 다른 유망한 연구의 길을 열 수 있다.

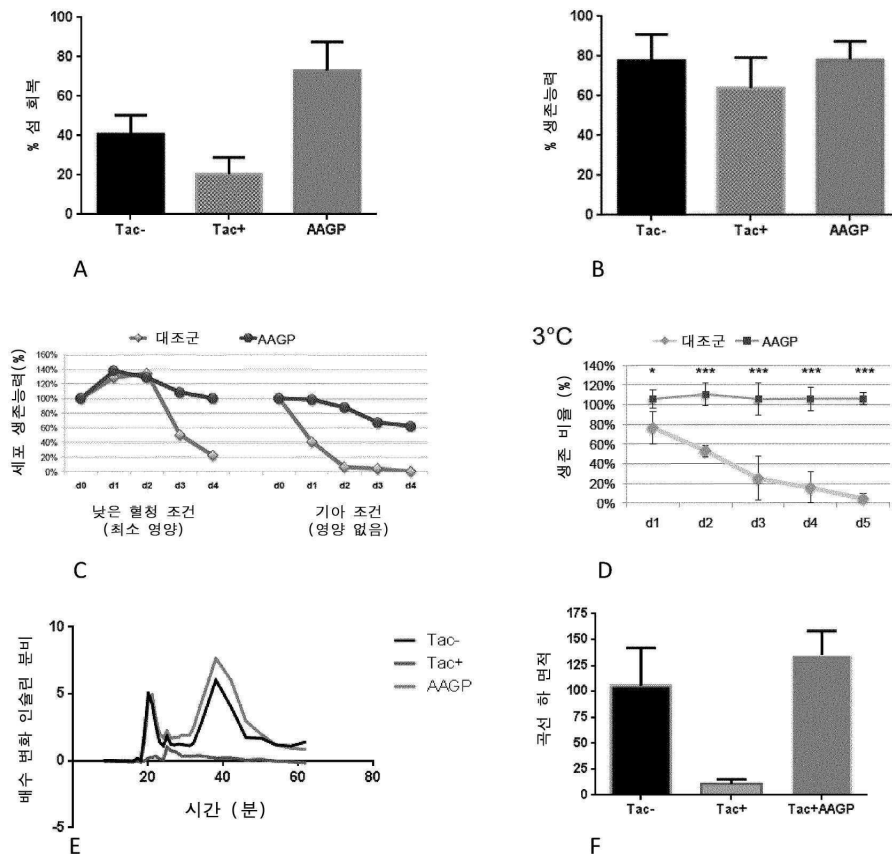
[0431] 첨부된 도면에 바람직한 실시형태들이 상술하고 예시하고 있을지라도, 본 개시 내용에서 벗어나지 않는 한 변형이 이루어질 수 있다는 것이 당해 기술분야의 숙련자에게 자명할 것이다. 이 같은 변형은 본 개시 내용의 범주 내에 포함되는 가능한 변형물로서 고려된다.

도면

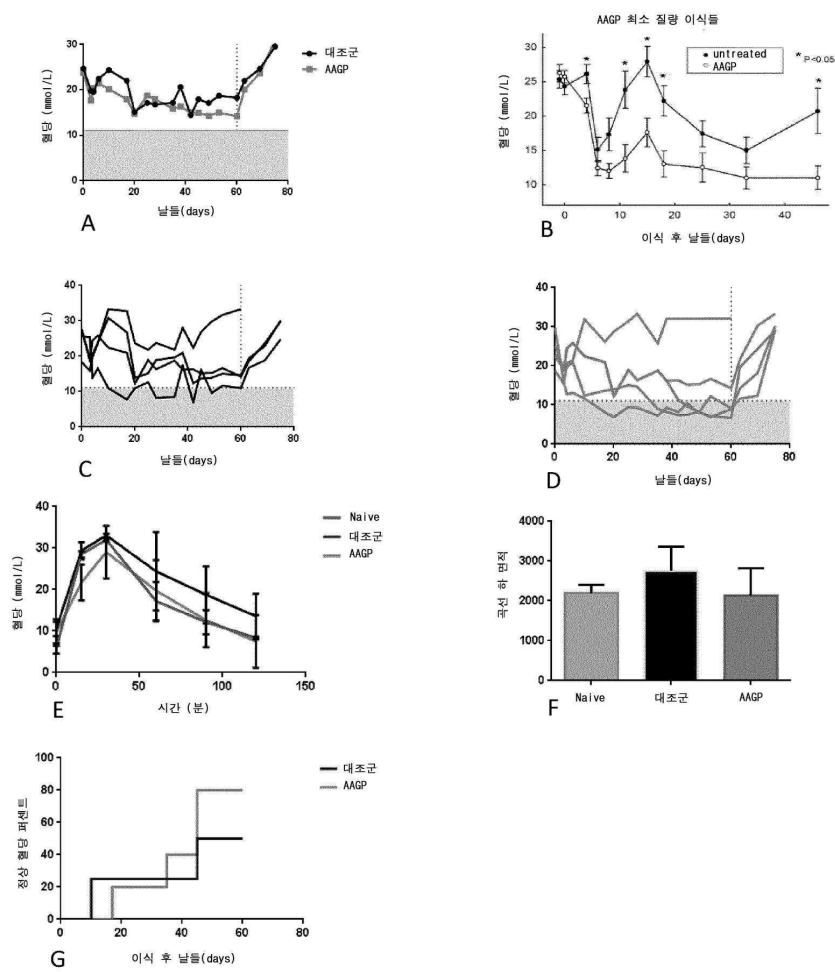
도면1



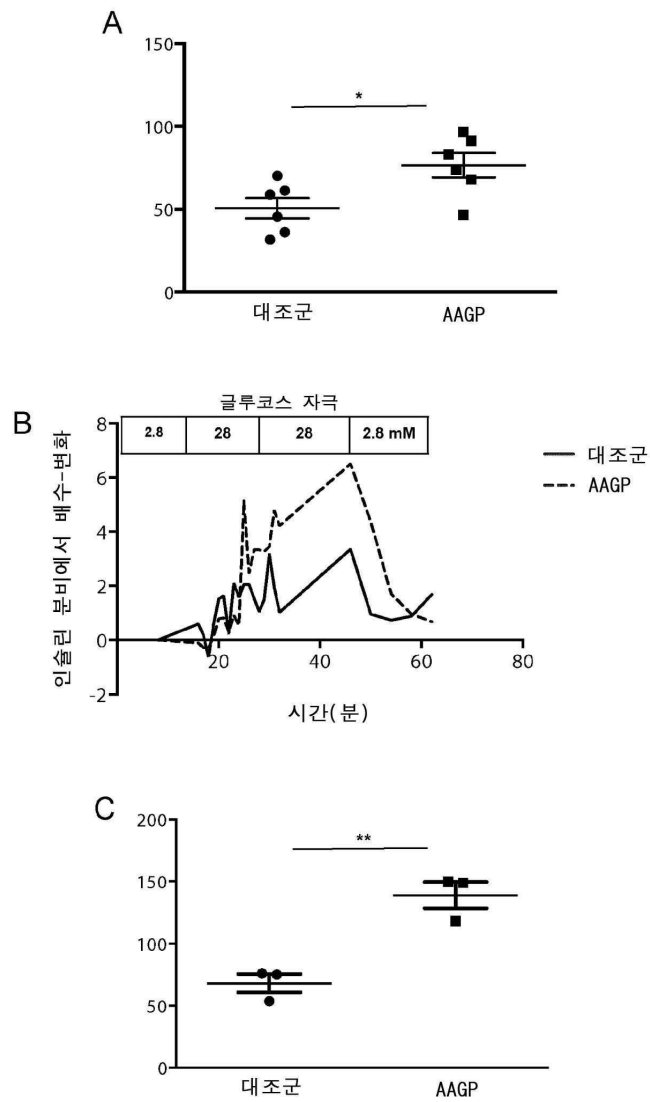
도면2



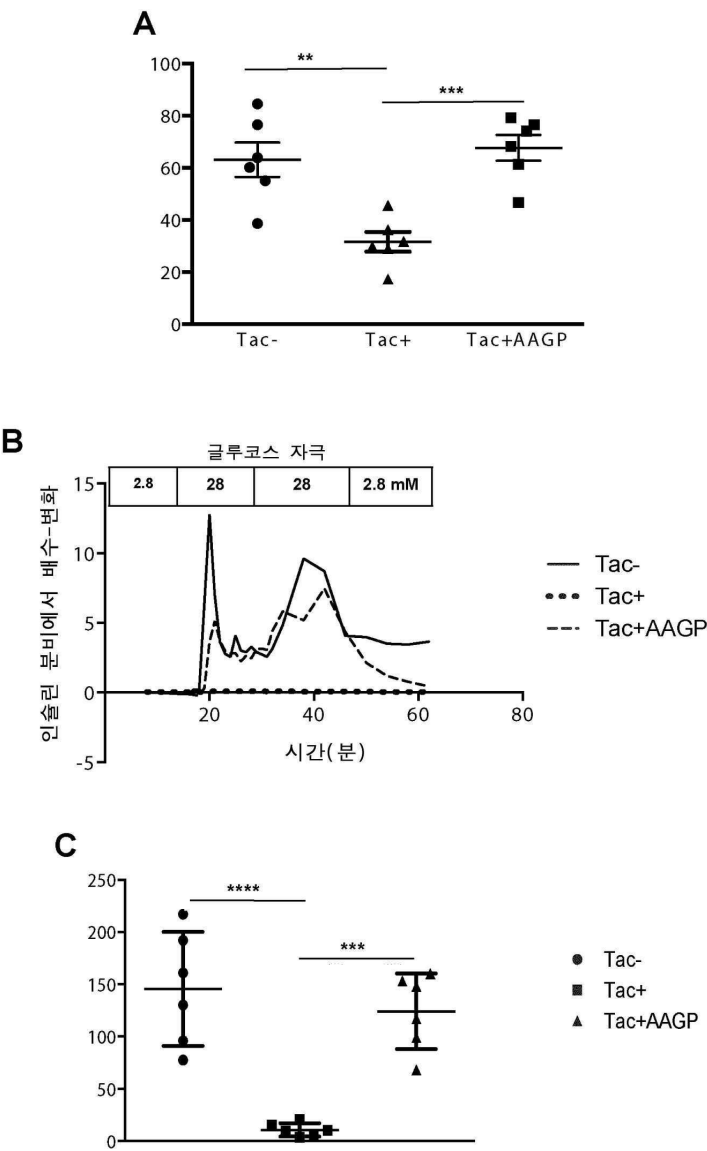
도면3



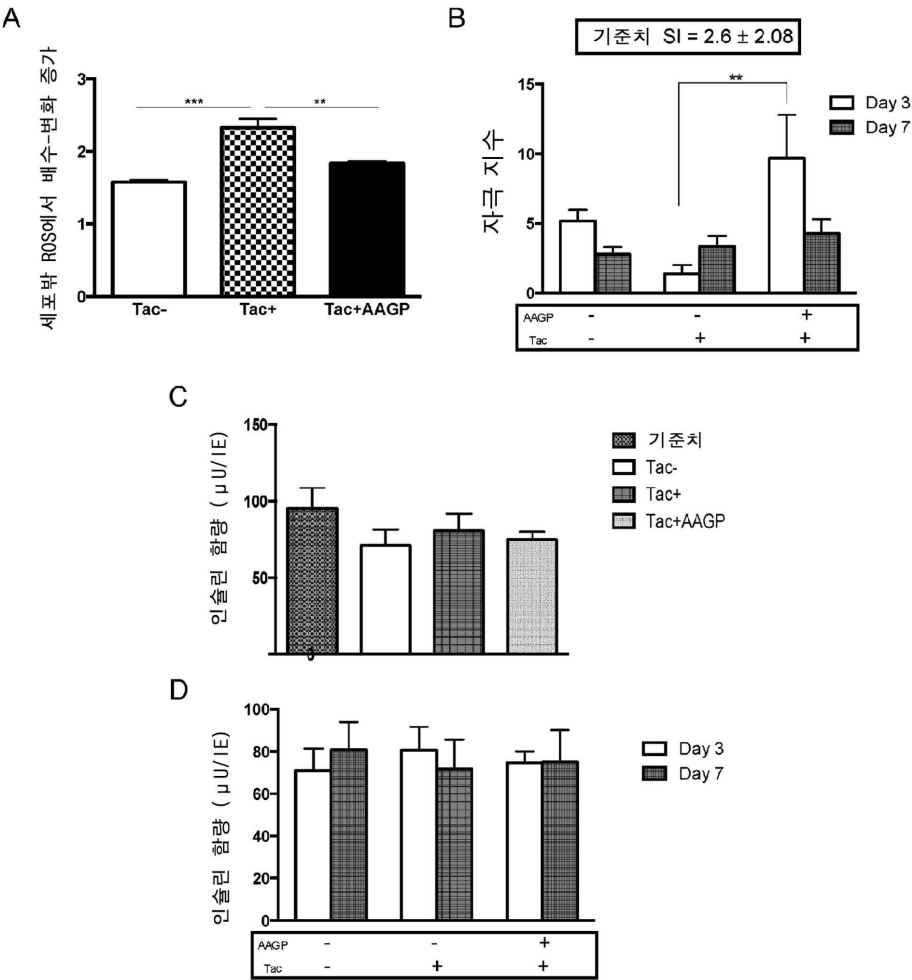
도면4



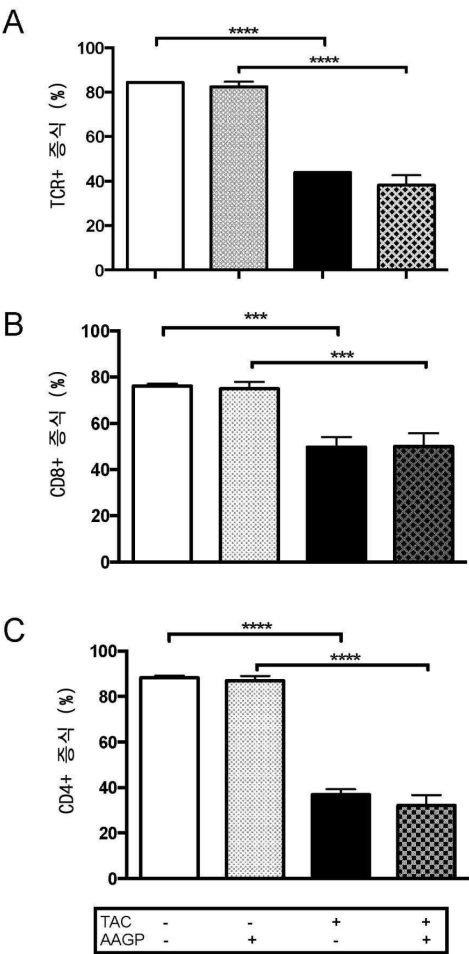
도면5



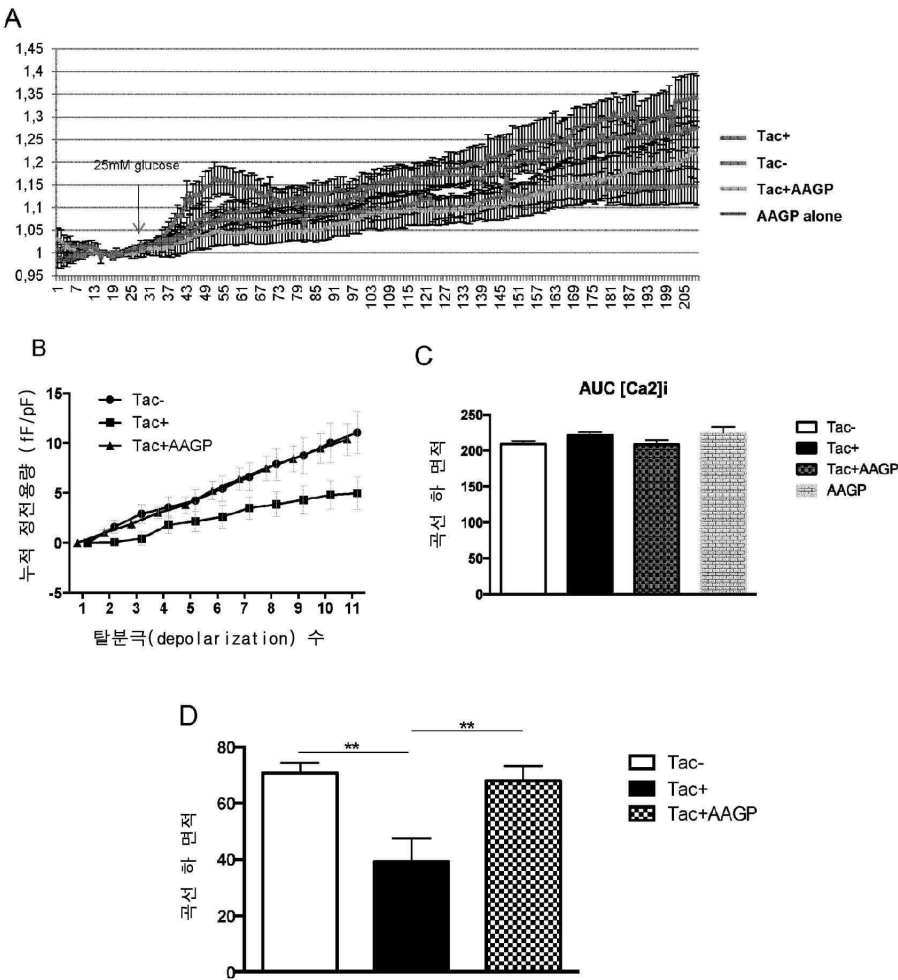
도면6



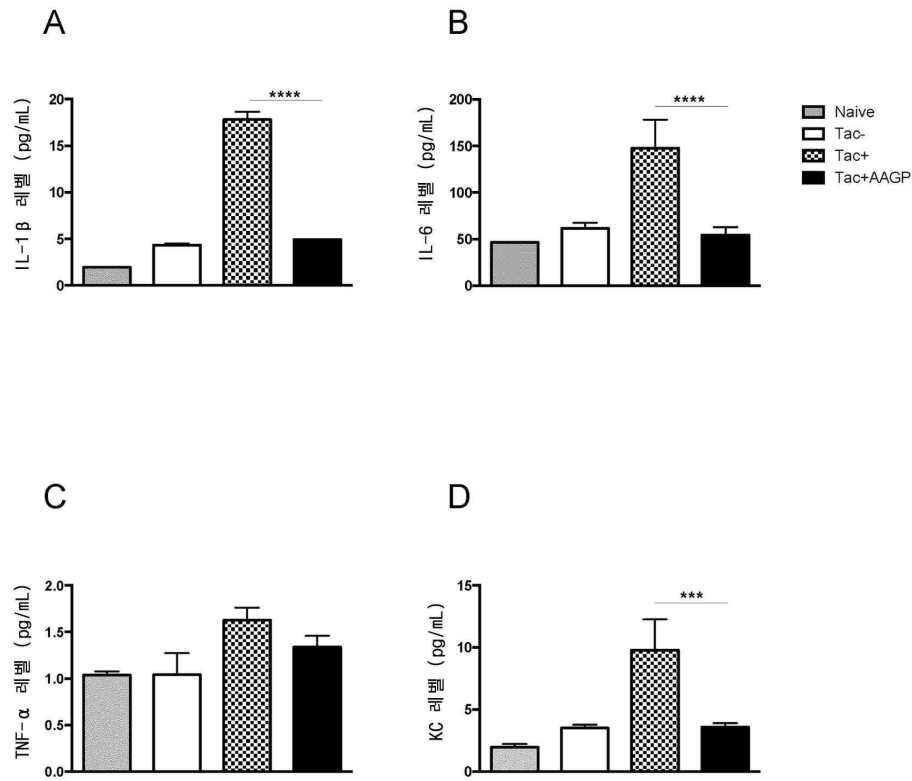
도면7



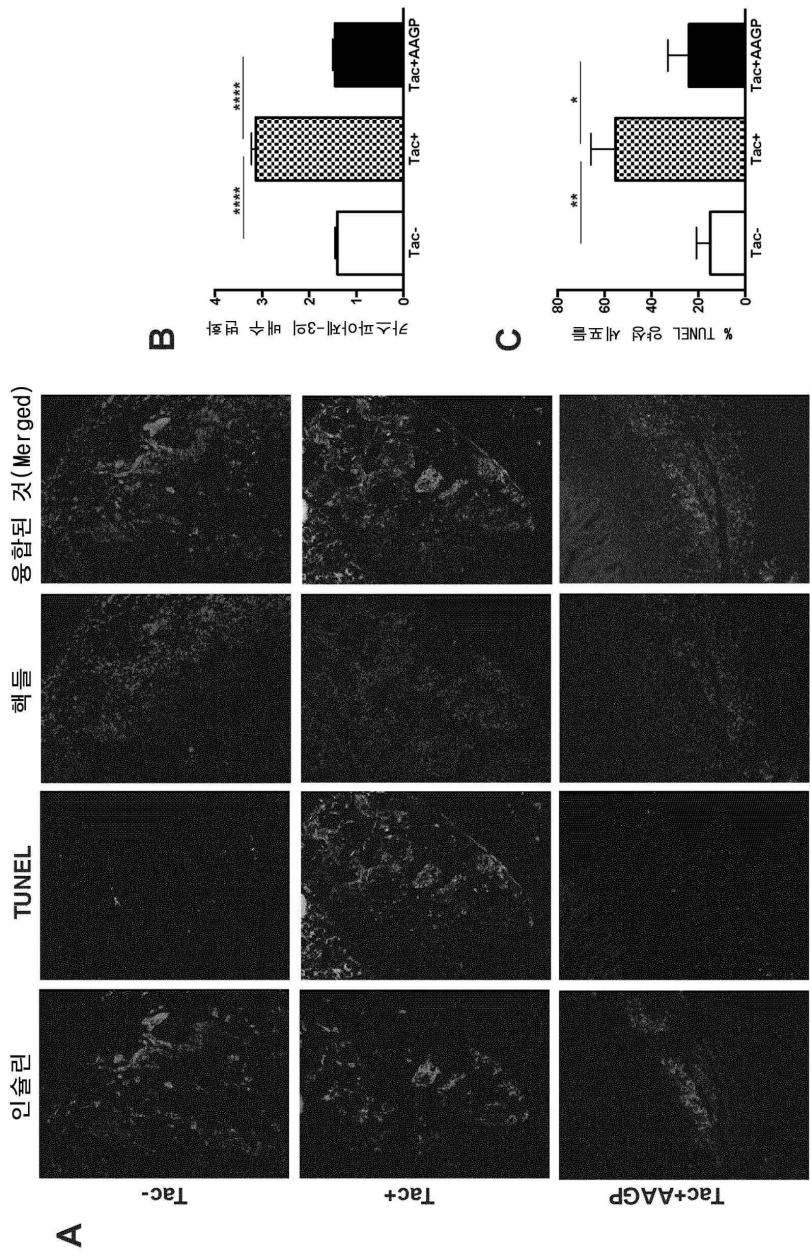
도면8



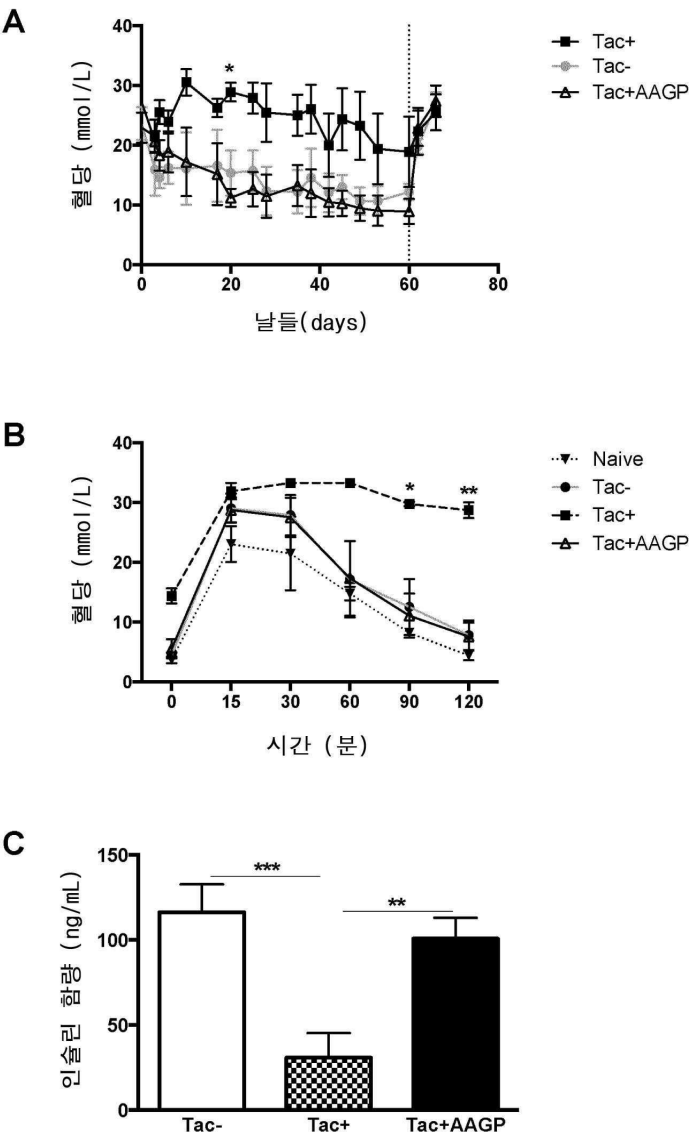
도면9



도면10



도면11a



도면11b

